

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Hana Urbánková

**Fylogeografie kudlanky nábožné
(*Mantis religiosa*) ve střední Evropě**

The phylogeography of the praying mantis
(*Mantis religiosa*) in central Europe

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Petr Janšta

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.8.2012

Podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat především svému školiteli Petru Janštovi a to nejen za veškerou pomoc při realizaci a sepisování této práce, ale hlavně za to, že mě svým přístupem dokázal nadchnout k vědecké práci. Děkuji Katce Černé za neocenitelné rady a pomoc při analýze mikrosatelitů. Velký dík patří také Danielu Jablonskému, který se podílel na sběru vzorků. Také bych ráda poděkovala Jirkovi Hadravovi za pomoc při práci, Daně Drožové a Barboře Křížkové za rady a podporu. Rodině a Janu Parčovi, kteří mě po celou dobu studia podporovali a měli se mnou obrovskou trpělivost. Další velké poděkování patří Michalu Wojtylkovi za technickou podporu, a nejen tu, při sepisování této práce. Práce vznikla za podpory GAUK 684412.

ABSTRAKT	6
ABSTRACT.....	7
1. ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	10
2.1 MANTODEA	10
2.1 HISTORIE VZNIKU	11
2.2 KUDLANKA NÁBOŽNÁ (<i>MANTIS RELIGIOSA</i>)	12
2.2.1 <i>Biologie</i>	12
2.2.1.1 Samec vs. samice.....	12
2.2.1.2 Zbarvení	13
2.2.1.3 Rozmnožování a schopnost partenogeneze	13
2.2.1.4 Kanibalismus	14
2.2.1.5 Letové schopnosti.....	14
2.2.1.6 Poddruhy	15
2.2.2 <i>Rozšíření</i>	15
2.2.2.1 Migrace v České republice	15
2.2.2.2 Současné světové rozšíření.....	16
2.2.2.2.1 Současné rozšíření v rámci ČR	16
2.2.2.2.2 Současné rozšíření v Evropě	18
2.2.2.2.3 Současné rozšíření mimo Evropu.....	20
2.3 BIOGEOGRAFIE A ŠÍŘENÍ DRUHŮ V EVROPĚ	21
3. MATERIÁL A METODIKA	24
3.1 MATERIÁL	24
3.2 METODIKA.....	28
3.2.1 <i>Izolace DNA</i>	28
3.2.2 <i>Mitochondriální geny</i>	28
3.2.2.1 Polymerázová reakce (PCR).....	28
3.2.2.2 Kontrola správného průběhu PCR.....	31
3.2.2.3 Příprava na sekvenci.....	31
3.2.2.4 Editace sekvencí	32
3.2.2.5 Analýza dat.....	32
3.2.2.5.1 Bayesovská analýza (BA)	33
3.2.2.5.2 Maximum likelihood (ML)	33
3.2.2.5.3 Haplotypová síť	33
3.2.3 <i>Mikrosatelity</i>	34
3.2.3.1 Výběr primerů	34
3.2.3.2 Polymerázová reakce (PCR).....	38
3.2.3.3 Kontrola správného průběhu PCR.....	39
3.2.3.4 Příprava na fragmentační analýzu	39
3.2.3.5 Značené primery a sestavování multiplexů.....	40

3.2.3.6 Fragmentační analýza	41
3.2.3.7 Analýza mikrosatelitových dat	42
4. VÝSLEDKY	43
4.1 CHARAKTER VSTUPNÍCH DAT	43
4.2 ANALÝZA DAT	44
4.2.1 Haplotypová síť.....	44
4.2.1.1 Haplotypová síť pro gen COI	44
4.2.1.2 Haplotypová síť pro gen COII.....	46
4.2.1.3 Haplotypová síť pro gen cytb	48
4.2.1.4 Haplotypová síť pro geny COI, COII a cytb.....	50
4.2.2 <i>Fylogenetické analýzy</i>	52
4.2.2.1 Dataset genu COI	52
4.2.2.2 Dataset genu COII	55
4.2.2.3 Dataset genu cytb	58
4.2.2.4 Dataset konkaténátu genu COI + COII.....	61
4.2.2.5 Dataset konkaténátu genu COI + cytb	64
4.2.2.6 Dataset konkaténátu genu COII + cytb.....	67
4.2.2.7 Dataset konkaténátu genu COI + COII + cytb.....	70
4.2.3 <i>Mikrosatelity</i>	73
5. DISKUSE.....	76
5.1 DATA.....	76
5.2 FYLOGENETICKÉ STROMY	77
5.3 HAPLOTYPOVÉ SÍTĚ	78
5.4 ŠÍŘENÍ.....	79
5.5 MIKROSATELITY	82
6. SHRNUÍ	84
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	85
8. PŘÍLOHY.....	96

Abstrakt

Kudlanka nábožná (*Mantis religiosa*) je jediný zástupce z řádu Mantodea vyskytující se ve střední Evropě. V České republice je její výskyt vázán na xerothermní stepní lokality zejména v oblasti jižní Moravy. Nicméně v posledních letech se tento druh šíří směrem na sever nejen v rámci České republiky, ale i dalších států střední Evropy. Tato práce je zaměřena na fylogeografii tohoto druhu na základě genetických markerů. Z výsledků vyplývá, že v Evropě se vyskytují pravděpodobně nejméně tři linie šíření kudlanek, které by mohly odpovídat glaciálním refugiím. První linie se šíří nejspíše z Pyrenejského ostrova, druhá linie má své centrum zřejmě někde v oblasti Krymu a poslední, třetí linii by bylo možné považovat za balkánskou linii. Rovněž bylo otestováno 9 funkčních mikrosatelitových lokusů, které budou v budoucnu sloužit k podrobnějšímu a přesnějšímu zjišťování šíření kudlanek z možných refugií.

Klíčová slova: *Mantis religiosa*, mtDNA, mikrosatelity, šíření, fylogeografie, fylogeneze.

Abstract

The praying mantis (*Mantis religiosa*) is the only representative of the order Mantodea in central Europe. Within Czech Republic, this species is distributed mostly on xerothermic localities in southern Moravia. However, *M. religiosa* has been spreading more to the north not only in Czech Republic, but also in other European countries recently. The aim of this study was to reconstruct phylogeography based on genetic markers. It seems that studied species was distributed at least in three lineages in Europe, which could be connected with glacial refugias. First lineage was spread to the north probably from Pyrenean peninsula, second lineage from Crimea peninsula and third lineage from Balkan area. Nine microsatellite loci were tested and will be used for consequent study of phylogeography and distribution of *M. religiosa* within Europe.

Keywords: *Mantis religiosa*, mtDNA, microsatellite, expansion, phylogeography, phylogeny.

1. Úvod a cíle diplomové práce

Řád Mantodea s téměř 2300 druhy (Ehrmann 2002) je kosmopolitně rozšířen, obývá nejrozličnější habitaty a zahrnuje predátory ostatních hmyzích skupin. Mezi jednotlivými členy tohoto řádu je velká diverzifikace ve vzhledu, potravních i obranných strategiích (Svenson & Whiting 2004).

Ve střední Evropě se z této skupiny vyskytuje pouze kudlanka nábožná (*Mantis religiosa* Linnaeus 1758), která je rozšířená prakticky po celém světě. Vyskytuje se v Evropě, kde severní hranice rozšíření dosahuje od 50° až do 54° severní šířky, v Africe, Asii i Austrálii a rozšířila se také v severní Americe, kam byla introdukována jako predátor rovnokřídlého hmyzu (Vidlička 2001).

Kudlanka nábožná je prakticky nezaměnitelný prvek české fauny, který je vázaný na sušší lokality stepního charakteru. Zároveň je to také velmi nápadný druh, který nelze přehlédnout. Vyskytuje se hojně v oblasti Moravy. Existují však už i lokality známé z české části republiky (Janšta et al 2008). Jak se zdá, její areál se rozšiřuje i v rámci celé střední Evropy, objevují se nové lokality například v Polsku (Liana 2007). Šíření tohoto druhu může mít souvislost i s rozšiřováním druhů jiných, a to zřejmě v důsledku oteplování klimatu. Jako příklad lze uvést druh *Metrioptera roeselii* Hagenbach 1822 (Orthoptera: tettigoniidae) (Gardiner 2009, Poniatowski 2012).

Tato práce vznikala díky fascinaci tímto druhem. Její šíření a expanze na nové lokality je v posledních několika letech zřetelná (Janšta et al. 2008) a stala se důležitým podnětem této práce.

Cíle práce:

1. Nashromáždit materiál kudlanky nábožné pokud možno z co nejvíce populací v rámci areálu rozšíření (původního i nepůvodního). Ovšem vzhledem k nutnosti odhalení fylogeografické struktury populací v rámci Evropy, je větší důraz kladen především na získání velkého počtu zástupců populací evropských.

2. U jednotlivých zástupců osekvenovat celkem 3 geny, které vykazují dostatečný signál pro rozlišení fylogeografické struktury kudlanky nábožné na celosvětové geografické úrovni a to mitochondriální geny cytochrom oxidáza I (COI – cca 800 bp), cytochrom oxidáza II (COII - 700 bp) a gen pro cytochrom b (Cytb – 700 bp).

3. Srovnat výsledky genetických analýz s geografickým rozšířením kudlanky nábožné (*Mantis religiosa*).

4. Sestavit multiplexy pro mikrosatelitové lokusy pro *Mantis religiosa* pro pozdější podrobnější analýzy fylogeografické struktury populací kudlanky nábožné, jejich populační struktury na okraji areálu, vliv migrace nebo genetickou izolaci okrajových populací ve střední Evropě.

2. Literární přehled

2.1 Mantodea

Název řádu je odvozený z řeckého výrazu pro věštce či proroka, který vychází z pozice, kterou kudlanky zauímají při lovu nebo číhání na kořist (Rondón et al. 2007).

Hmyzí řád kudlanky (Mantodea) je velice dobře morfologicky rozlišitelnou skupinou zahrnující predátory ostatních hmyzích skupin. Jsou velmi nápadnou a nezaměnitelnou skupinou, na první pohled charakteristickou přeměněným prvním párem končetin na specifický lapací orgán, označovaným jako loupeživé nohy. Zpravidla dosahují velikosti od 5 do 10 cm. Většina druhů je zeleně či hnědě zbarvená, v tropech je běžné mimetické či aposematické zbarvení (Kočárek 2005). Monofylii tohoto řádu recentně potvrdili Svenson & Whiting (2009).

Celkem bylo popsáno 2366 druhů ve 436 rodech (Otte & Spearman 2005).

Celá skupina má kosmopolitní rozšíření, ale největší diverzita je soustředěna do tropických oblastí celého světa. Zástupci tohoto řádu obývají různé biotopy. Od hustých tropických deštných lesů kolem rovníku přes suché lesy až pouště Afriky a Austrálie, a vyskytují se také v temperátních zónách. V neotropické oblasti kudlanky dokonce dosahují až do nadmořské výšky kolem 3000 m. n. m. (Rondón et al. 2007).

Ve střední Evropě se v přírodě vyskytuje pouze druh *Mantis religiosa* Linnaeus 1758 (Kočárek 2005).

Mezi členy řádu Mantodea je značná diverzifikace jak v morfologii, tak i strategii lovu. Většina také ovládá kamufláž, krypsi, mimezují mravence, květy, větvičky nebo kůru. (Svenson & Whiting 2004). Členové tohoto řádu na kryptické zbarvení a své chování spoléhají. Umožňuje jim lov potravy a vlastní obranu před predátory. Jsou schopni strávit dlouhou dobu bez pohybu (Gemeno & Claramunt 2006).

Na neznámé vztahy v rámci řádu Mantodea se zaměřili Svenson & Whiting (2004), kteří zkoumali 5 genů na asi 63 taxonech. K molekulárním studiím využívali i morfologické znaky jako je lovecká strategie jednotlivých skupin. Rozdělovali je na tři kategorie. Generalisty, kteří využívají různé strategie k lovu, lovcí kořist při běhu (cursorial) a lovcí ze zálohy (ambush). *M. religiosa* patří do kategorie lovcí ze zálohy.

Svenson & Whiting (2004) vypracovali první formální fylogenezi Mantodea založenou na kvantitativních analýzách dat. To jim umožnilo testovat monofylii čeledi a podčeledí řádu Mantodea, zhodnotit klasifikaci podle Ehrmann (2002) a posoudit

fylogenetické vzory loveckých strategií. Ve své práci zjistili, že většina čeledí a podčeledí jsou parafyletické. A většina znaků je homoplazických. Parafyletická je i čeleď Mantidae, kam patří *M. religiosa*.

2.1 Historie vzniku

Fosílie kudlanek jsou velmi vzácné, nejstarší pocházejí z paleocénu, klasifikace je tedy založena na studiu recentních zástupců (Kočárek 2005). Fosilními záznamy řádu Mantodea se zabýval Grimaldi (2003). Zkoumáním fosilií zjistil, že velký počet vyhynulých linií divergoval ještě v době, než se objevovaly kudlanky, jak je známe z dnešní doby (současné linie Eumantodea). Tyto časné linie se vyskytovaly globálně. Většina diverzity vznikla v období paleocénu. Otázkou divergence linií kudlanek se zabývali také Svenson & Whiting (2009). Dle jejich výzkumu, vystavěném na analýze devíti genů, se řád Mantodea objevil na hranici Triasu a Jury a pravděpodobně divergoval z předka moderních švábů. Grimaldi (2003) tuto událost zasadil na počátek Jury před přibližně 200 miliony let, což je v souladu s názorem Svensona & Whitinga (2009).

Otázkou je, kde k této události došlo a které místo může být považováno za kolébku řádu Mantodea. Pokud vycházíme z výše zmíněného časového údaje, pak v té době byla pevnina rozdělena na Gondwanu a Laurasii. Fosilní záznamy se objevují na obou těchto prakontinentech (Svenson & Whiting 2009).

Členové skupiny Dictyoptera zahrnující řády Mantodea (kudlanky), Blattodea (švábi) a Isoptera (termity), kteří zřejmě sdílí společného omnivorního detritofágního předka z období Jury (přibližně 200 – 150 mil let), starší fosílie mohou pocházet zřejmě z Křídy (Ware et al. 2008).

Co se týká příbuznosti s jinými řády, tak Svenson & Whiting (2004) zmiňují několik teorií příbuznosti mezi skupinou Blattopteroidea (dnes spíše označované jako Dictyoptera), a to:

- (1) Mantodea jako sesterská skupina Isoptera a Blattodea,
- (2) Isoptera jako sesterská skupina Mantodea a Blattoptera,
- (3) a nakonec teorie s největší podporou: Mantodea sesterskou skupinou Blattoptera a Isoptera, kdy subsociální cryptocercidní švábi jsou sesterskou skupinou termitů.

Stejně teorie příbuznosti zmiňuje i Kambhampati (1995), který se také zabýval příbuzností mezi těmito třemi řády. Do svých výzkumů zahrnul pouze jediný druh z řádu Mantodea a to druh *M. religiosa*.

Při řešení příbuznosti těchto tří řádů je velmi důležitý výběr genů. Topologie se totiž vzájemně liší právě v závislosti na výběru genů, které jsou do analýzy zahrnuty. A také přidání řádu Mantodea značně ovlivňuje výslednou topologii Dictyopter (Ware et al. 2008).

2.2 Kudlanka nábožná (*Mantis religiosa*)

Tento druh je charakterizovaný přítomností široké černé skvrny na vnitřní straně předních končetin (Wagan et al. 1995), někdy s bílým kruhem uprostřed skvrny připomínající oko (Abu-Dannoun & Katbeh-Bader 2007).

Do rodu *Mantis* patří celkem jedenáct druhů. Mimo druhu *Mantis religiosa*, jsou známy ještě druhy *Mantis beieri* Roy, 1999, *Mantis callifera* Wood-Mason, 1882, *Mantis carinata* Cosmovici, 1888, *Mantis dilaticollis* Gistel, 1856, *Mantis emortualis* Saussure, 1869, *Mantis griveaudi* Paulian, 1958, *Mantis insignis* Beier, 1954, *Mantis macroalata* Lindt, 1973, *Mantis octospilota* Westwood, 1889, *Mantis splendida* de Haan, 1842.

2.2.1 Biologie

Pokud se budeme zabývat šířením kudlanky nábožné (*Mantis religiosa*), je třeba zmínit také biologii tohoto druhu, která se na její migraci podílí.

2.2.1.1 Samec vs. samice

V souvislosti s terénní prací je důležité rozpoznat samce od samice. U dospělých jedinců je to snadné. Samice je oproti samci větší a robustnější. Zatímco samice může dosahovat velikosti mezi 45-77 mm, velikost samce se pohybuje mezi 40-52 mm a jeho tělo je štíhlejší. Rozpoznávacím znakem mohou být i tykadla, která jsou u samců delší. Dalším znakem může být i tvar zadečku, který je u samců úzký a u samic mohutnější (Chládek 1998 a Kočárek 2005).

2.2.1.2 Zbarvení

Chládek (1998) uvádí dvě nejčastější zbarvení jedinců kudlanky nábožné, a to zelené a hnědé. Poukazuje na skutečnost, že zelené zbarvení zpravidla převládá. V roce 1997 pozoroval populaci na Děvíně v Pavlovských kopcích, kde zelené zbarvení převažovalo. Dokonce i v září a říjnu, kdy jsou kudlanky s takovýmto zbarvením velmi nápadné na usychající vegetaci. Vyjádřil i číselný poměr, 1:10, v počtu hnědých a zeleně zbarvených kudlanek, opět na základě pozorování na různých lokalitách na Moravě. Pro zajímavost uvádí dokonce i jeden zaznamenaný nález černě zbarveného jedince, kterého našel Hoffer (1937).

Dle Chládky (1998) není barvoměna příliš častá. Zbarvení u druhu *Mantis religiosa* bylo předmětem studia i Battistona & Fontany (2010). Zaznamenali vyšší výskyt hnědých jedinců na počátku sezóny a s postupujícím létem se začali více objevovat jedinci zbarvení zeleně. Zhodnotili tento jev jako klimatický trend (v závislosti na intenzitě světla), a v závislosti na vzrůstu vlhkosti. Barvoměna se tedy řídí klimatickými podmínkami, spojenými s úbytkem denního světla ke konci sezóny. Na svém pokusu prokázali, že *Mantis religiosa* vykazuje schopnost měnit barvu i v dospělém stádiu a to bez potřeby svlékání. Jde proto o mnohem pomalejší změnu. Vyžaduje dobu spíše několik dní než pouhých hodin. A také se nejedná o změnu barvy, která by zahrnovala celé tělo, ale spíše jen určité části.

Barva se mění v závislosti na místě, kde je možné se lépe skrýt. K barvoměně dochází zejména, pokud dosahuje teplota vyšších hodnot, vlhkost prostředí je nízká a dochází k intenzivnímu osvětlení habitatu a začíná vegetace hnědnout. Musíme ale zahrnout ještě dva další faktory. A to riziko, že jedinec nepřizpůsobený barvě prostředí bude pravděpodobně terčem predátora, který ho tak snadněji odhalí a také skutečnost, že *Mantis religiosa* zřejmě vyhledává prostředí, které odpovídá jejímu aktuálnímu zbarvení (Battiston & Fontana 2010).

2.2.1.3 Rozmnožování a schopnost partenogeneze

Samička klade vajíčka koncem léta a počátkem podzimu. V jednom kokonu, tzv. oothéce, bývá v průměru až 200 vajíček. Oothéky klade samice na chráněných místech, často pod kameny či na větve nebo pevnější rostliny a to nepříliš vysoko.

Bazyluk (1977) popisuje, že kudlanka je schopná partenogeneze, což se dle něj může poměrně výrazně podílet na šíření tohoto druhu.

Ze samečkem oplozených vajíček se na jaře líhnout larvy samečků i samic. Jejich vývoj zahrnuje sedm stádií. Pokud k oplození vajíček nedojde, vyvíjí se z vajíček pouze samičky a to v šesti stádiích (Bazyluk 1977).

Chládek (1998) se ve své práci zmiňuje o dlouholetém pozorování kudlanky na lokalitě blízko obce Popovice u Rajhradu. V letech 1992 až 1995 zde objevil populaci kudlanek sestávající pouze ze samic. Před čtyřiceti lety však v této oblasti nebyl tento druh objeven, přestože zde autor prováděl pravidelný entomologický průzkum. V chladnějším roce 1997 nebyla kudlanka opět nalezena. Chládek (1998) nevylučuje, že partenogeneze by mohla být pouze doplňkovým typem rozmnožování při proniknutí na nové lokality v závislosti na mikro- a makrohabitatu a čase.

2.2.1.4 Kanibalismus

Dle Chládky (1998), který pozoroval kopulaci kudlanek, nebyl tento jev spolehlivě prokázán. Uvádí, že kopulace během chladnějšího počasí mohla trvat i pět hodin.

Prokop & Václav (2008) se zabývali výskytem kanibalismu u druhu *Mantis religiosa* na základě sezonních aspektů a také reprodukčním chováním. Došli k závěru, že u výskytu sexuálního kanibalismu hraje poměrně zásadní roli doba, kdy dojde k poslednímu svlékání samice do dospělosti. Šance samce na přežití je ovlivněno jeho stavem. Samci s lepší kondicí mají větší šanci přežít riziko kanibalismu samicí Prokop & Václav (2004). Tito autoři rovněž uvádí, že *Mantis religiosa* je polygammí druh schopný se pářit s více samci.

2.2.1.5 Letové schopnosti

V souvislosti s migrací na nová stanoviště je nutné zmínit i letové schopnosti tohoto druhu. Kudlanky jsou poměrně přeceňovanými letci. Chládek (1998) uvádí, že samečci v teplých dnech létají dobře a často, ale pouze na kratší vzdálenosti a to za účelem vyhledání samičky. Při vyplašení dokážou urazit až 50 metrů. Podobně samičky, které jsou takto schopny absolvovat let dlouhý jen 10 – 15 metrů.

2.2.1.6 Poddruhy

Bazyluk (1960) klasifikoval kudlanku nábožnou do celkem sedmi poddruhů kudlanky nábožné. A to:

Mantis religiosa religiosa Linnaeus 1758,

Mantis religiosa inornata Werner 1930

Mantis religiosa polonica n. ssp.

Mantis religiosa eichleri n. ssp.

Mantis religiosa siedleckii n. ssp.

Mantis religiosa sinica n. ssp.

Mantis religiosa bey-bienkoi n.ssp.

Bazyluk (1960) uvádí dva z těchto poddruhů z Evropy. Konkrétně *Mantis religiosa religiosa* Linnaeus, 1758, vyskytující se v severní Africe, jižní a střední Evropě (včetně Slovenska) a na Blízkém východě (až po západní Irán). A druhým poddruhem je *Mantis religiosa polonica*, Bazyluk, 1960, která se vyskytuje v Polsku, Rakousku a evropské části Ruska.

Vidlička (2001) a Kočárek (2005) však morfologické rozlišení minimálně dvou evropských poddruhů zpochybňují a považují za neoprávněné.

Rozšíření dalších poddruhů je dle Bazyluka (1960) následující: *M.r. inornata* se vyskytuje v Indii, Iránu a jihoasijské části bývalého Sovětského svazu: *M.r. eichleri* v Beninu, Burkině Faso, Etiopii, Francouzské Guyneaně, Gambii, Keni, Mauretánii, Nigeru, Pobřeží Slonoviny, Senegal, Severní Rhodesii, Sudánu, Tanganice, Togu, Ugandě: *M.r. siedleckii* je známa z jižní části Malajsie, Tchaj-wanu, Jávy a Celebesu: *M.r. sinica* byla popsána z jihovýchodní části Ruska, v Číně, Japonsku, Korei a severní části Vietnamu: *M.r. bey-bienkoi* je rozšířená na Sibiři, v Kazachstánu, Tádžikistánu a východním Rusku.

2.2.2 Rozšíření

2.2.2.1 Migrace v České republice

Migrace kudlanky nábožné byla v minulosti umožněna příznivým stavem krajiny, který zahrnoval různé meze, pastviny či úhory, která plnila funkci přirozených biokoridorů. Těmi se kudlanky mohly za oteplení klimatu koncem čtyřicátých a začátkem padesátých let šířit. Za nepříznivého klimatu se pak stahovaly směrem na jih

od Brna. Díky tomuto zvětšování a zmenšování areálu může být kudlanka nábožná modelovým příkladem pro migraci i jiných druhů hmyzu (Chládek, 1998).

Chládek (1998) nediskutuje pouze cesty přes původní i nové umělé biokoridory, ale také možnost pasivního šíření tohoto druhu různými dopravními prostředky. Neopomíná ani časté nálezy v okolí železnic a nádraží. Nevylučuje ani vypuštění kudlanek z chovu, které uvádí jako vysvětlení pro výskyt tohoto druhu na brněnských sídlištích.

Kudlanka nábožná vykazuje také tendenci šířit se severním směrem. Na tuto skutečnost poukázal Pax (1921).

2.2.2.2 Současné světové rozšíření

Mantis religiosa je rozšířena v Evropě, Asii, Africe a Austrálii. Severní hranice výskytu v Evropě probíhá přes jižní Belgie, Německo, Polsko, Rusko a Japonsko (Hanák & Hudeček 2001). Podle Vidličky (2001) se kudlanka vyskytuje v jižní a střední Evropě, v Asii (až po Japonsko) a v Africe. Introdukována byla do Ameriky (Bolívie, Jamajka, USA a do Kanady). Vidlička (2001) podává také přesnější informace k severní hranici výskytu v Evropě, která prochází Francií (až k 50° severní šířky), Belgií, Německem, Švýcarskem a severní Itálií (jižní Tyrolsko), Rakouskem, Českou republikou, Slovenskem, jižním Polskem, Ukrajinou a Ruskem (až k 54° severní šířky).

Podrobněji mapuje výskyt Bazyluk (1960).

2.2.2.2.1 Současné rozšíření v rámci ČR

Kudlanka nábožná byla v českých zemích považována za vzácný xerofilní druh vyskytující se pouze na stepích (Čejchan, 1983). V Čechách se nepovažuje za původní, a jednotlivá hlášení o výskytu zahrnují zavlečené jedince (Novák & Spitzer, 1982). U nás je v současné době klasifikována jako chráněný a zranitelný druh (Janšta et al. 2006). Od 90. let dvacátého století se prokazatelně šíří směrem na sever (Janšta et al. 2008).

O průniku kudlanky do Moravské brány uvažuje Záleský (1935). Očekávaný výskyt v Moravské bráně byl skutečně potvrzen (Hanák & Hudeček 2001). Pokud bychom hledali nejsevernější lokalitu na Moravě a ve Slezsku, lze za ni považovat

Jeseník (Lemon 1998). Hanák a Hudeček (2001) uvádějí za velmi pravděpodobné i další možnosti nálezů a šíření na nových lokalitách na severní Moravě a ve Slezsku.

Janšta et al. (2008) zaznamenali výskyt kudlanky nábožné ve středních Čechách na lokalitě Přerovská hůra u Přerova nad Labem v letech 2000, 2003 a 2004. Jednalo se o jižně orientovaný exponovaný svah s jílovitým podkladem a teplomilnými rostlinami. Další nálezy v Čechách byly zaznamenány v Praze na Kavčích horách (2005), Kolíně (2006), NPR Kněžičky, okres Nymburk (2006) a ve Vehlovicích u Mělníka (2007).

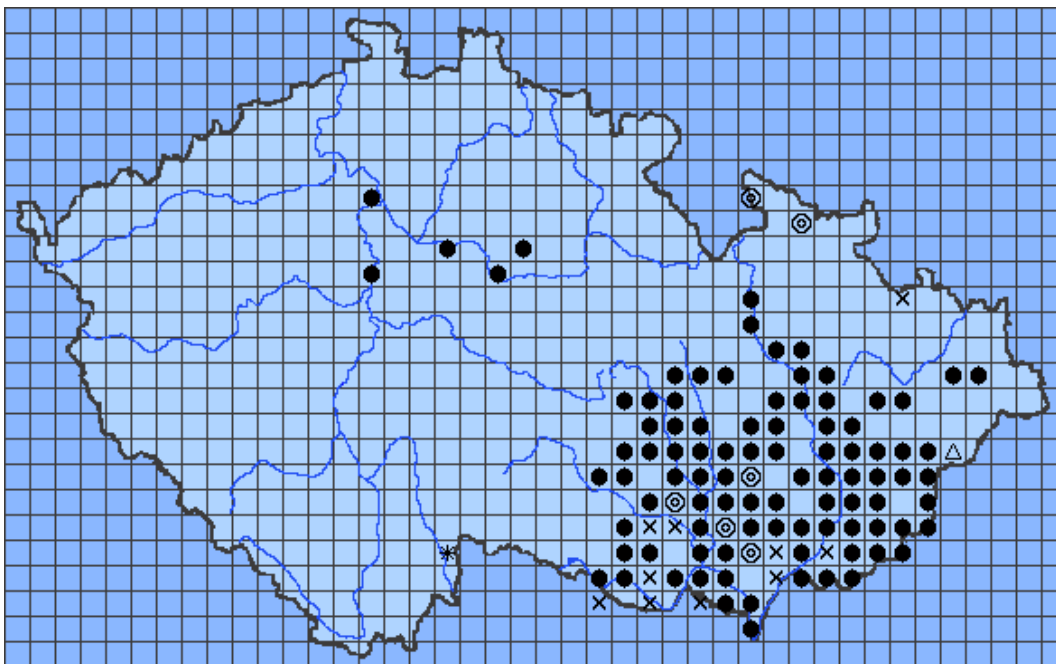
V letech 2003-2007 byla kudlanka nábožná opět opakovaně zaznamenána na různých místech na území Čech, zejména v oblasti Polabí kolem železničních koridorů. Nelze vyloučit záměrné zavlečení jednotlivých kusů např. z mediteránní oblasti, nicméně lze uvažovat o rozšíření pomocí tzv. 'hitch-hiking' způsobem náhodného využití dopravních prostředků (Janšta et al. 2008).

Do roku 1990 bylo z jižní Moravy publikováno celkem 34 lokalit. V letech 1990 – 1998 bylo publikováno 45 nových lokalit (Gruchala 2010).

Během posledních dvaceti let dochází k poměrně rychlému šíření po celé Moravě a obsazování nových lokalit (Janšta 2006).

Mantis religiosa byla zaznamenána také na Českomoravské vrchovině na území NNM Švarec, na severozápadní hranici výskytu v České republice (Tichá 2005). Silnější populace mimo centrum výskytu byly objeveny také u obcí Kuřimská Nová Ves (Nenadál 1995), Tišnov (vrch Květnice) a Mohelno (Hanák & Hudeček 2001).

Podrobnou faunistickou mapu s výskytem kudlanky nábožné na našem území lze nalézt na biolibu (www.biolib.cz, viz obr. 1)



Obrázek 1: Výskyt *Mantis religiosa* na území ČR. Staženo z www.biolib.cz ke dni 13. 7. 2012. Legenda:
 ● - stálý výskyt, ▲ - introdukovaný, ☒ - pozorován do roku 1960, ☒ - pozorován do roku 2000.

2.2.2.2.2 Současné rozšíření v Evropě

Záznamy o výskytu *Mantis religiosa* v Rakousku pochází z osmdesátých let dvacátého století z oblastí jižního Štýrska, Dolních Rakous, Burgenlandu a zřejmě se kudlanka nábožná vyskytuje také v Korutanech. Nálezy pochází i z oblasti města Graz, kde tento druh na přelomu devatenáctého a dvacátého století vymizel, zřejmě na základě klimatických faktorů a započetí používání chemikálií v potravinářském průmyslu (Gepp & Kreissl 1988).

O něco později, roku 2002, byl publikován první výskyt kudlanky nábožné také z Horních Rakous, konkrétně z Linze a Schwertbergu, kde se jednalo o nálezy na budovách. Zpočátku to bylo považováno za zavlečení, ale ten samý rok byla nalezena ještě na dvou jiných místech a tudíž se pravděpodobně jedná o přirozený výskyt. Horní Rakousy jsou svými přírodními podmínkami pro výskyt tohoto druhu vhodné (Schwarz-Waubke et al. 2002).

O několik let později byla *M. religiosa* nalezena také na území Saska. Nicméně těžiště rozšíření tohoto druhu leží zřejmě na jihozápadě Německa. Zřejmě v oblasti Baden-Württemberg a v oblasti horního údolí Rýna (Berg et al. 2008).

Četné záznamy o výskytu *M. religiosa* pochází i z území Slovenska, konkrétně z území Podunajské nížiny. Krištín et al. (2004) se v letech 2002-2003 zabývali výzkumem přítomnosti různých druhů z řádu Orthoptera a z řádu Mantodea, z nichž se na území Slovenska vyskytuje pouze *Mantis religiosa*. Kudlanka byla zjištěna na všech 11 studovaných lokalitách zahrnujících území váťých písků a písečných dun na severu jižního Slovenska.

Prokop a Václav (2008), kteří pro svůj výzkum využívali jedince získané odchytom ve volné přírodě zmiňují *M. religiosa* z území Slovenska v blízkosti města Trnavy.

Podobnou informaci poskytuje i výzkum vizuální orientace *Mantis religiosa*, která byla prováděna na území Slovinského krasu poblíž hranic s Itálií (Kral & Devetak 1999). Další práce, která zahrnovala výzkum v terénu, byla prováděna poblíž Vicenza v Severní Itálii (Battiston & Fontana 2010).

M. religiosa je prvkem i polské fauny. Její první záznam z území tohoto státu pochází z 18. století, ale i tak se zde nejspíše vyskytovala už před touto dobou. Liana (2007) uvádí poměrně detailní výskyt tohoto druhu na území Polska, včetně historického výskytu. Uvádí přibližně 208 lokalit výskytu kudlanky a rozděluje je na dvě území: oblast Sandomierszkou a Karpatskou.

Bilousov et al. (2011) našli kudlanku nábožnou na dvou lokalitách v okolí Mykolaivu a Kanivu na Ukrajině. Zkoumali, zda není *Mantis religiosa* napadena intracelulárním prokaryotickým symbiontem rodu *Wolbachia*. Měli k dispozici celkem 3 jedince. Dvě samice pocházející z oothéky nalezené na lokalitě Kaniv a jednu z lokality Mykolaiv. *Wolbachia* byla poprvé prokázána na jedincích *Mantis religiosa*.

Další kusou informací o výskytu je práce Gemena et al. (2005), ve které se zaměřují na volací chování (calling behavior) *Mantis religiosa*. Zmiňují získávání jedinců také odchytom z volné přírody. Tentokrát z okolí města Lleida ve Španělsku. Odchyt ze stejné lokality byl použit i v pozdější práci Gemeny & Claramunt (2006).

Práce je zaměřena na rozšíření, které je na okraji areálu a rozšíření kudlanky nábožné zde není kontinuální jako v jižních státech.

2.2.2.2.3 Současné rozšíření mimo Evropu

Wagan et al. (1995) se zabývali skupinou Mantodea, konkrétně podčeleděmi Mantinae, Photininae a Hymenopodinae, jejíž výskyt zkoumali na území Pákistánu, v provincii Sindh. Potvrdili výskyt pěti druhů, jedním z nich byla i *Mantis religiosa*.

Cannings (2007) mapoval výskyt *Mantis religiosa* na území Kanady v Britské Kolumbii. Zmiňuje, že byla v roce 1934 introdukována do Okanagan Valley jako predátor rovnokřídleho hmyzu, ale kvůli své pomalé reprodukci nebyla pro tento účel příliš vhodná. Následně se rozšířila a Cannings uvažuje nad možností, že by další populace pocházely právě ze zmíněného výsadku z roku 1934. Podle něj *M. religiosa* zřejmě expanduje ve směru z jihu na sever. Jedinci nejspíše putují z dlouhodobé lokality a pravděpodobně se nejedná o nějakou nezávislou introdukci. Jedná se o výsledek dvou jevů: disperze přírodní cestou a také pomocí lidské činnosti. Dospělci i oothéky mohou být člověkem transportovány na velké vzdálenosti. Na území Kanady se dále vyskytuje v oblasti Mississauga, Caledon, Stoney Creek a Grimsby (Ontario), odkud byli shromážděni jedinci na výzkum stridulace a akustických signálů u *Mantis religiosa* (Hill 2007).

Mantis religiosa se stala, jakožto predátor nejen orthopterního hmyzu, i předmětem výzkumu zabývající se efektem predátorů na populace různých druhů členovců, probíhajícím v Newarku v Delaware (Fagan & Hurd 1991, Fagan & Hurd 1994, Fagan et al 2002).

M. religiosa byla podle Gurneye (1950) introdukována z Evropy na severovýchod USA v roce 1899. Předtím se na území USA nevyskytovala (Rathet & Hurt 1983).

Abu-Dannoun & Katbeh-Bader (2007) popsali v letech 2003 – 2005 z území Jordánska celkem 16 druhů z řádu Mantodea. Byla mezi nimi i *M. religiosa*.

Výskyt v Severní Americe je patrný také z článku Yager & Hoy (1989), kteří pro svůj výzkum vnímání zvuku u druhu *Mantis religiosa* používali jedince odchycené ve volné přírodě blízko města Ithaca, N.Y.

Z centrální a jižní Ameriky existuje několik checklistů, které uvádějí výčet druhů vyskytujících se v této oblasti (Rondón et al. 2007, Ehrmann & Koçak 2009), ani jeden z nich neuvádí druh *Mantis religiosa*, na který je tato práce zaměřena.

2.3 Biogeografie a šíření druhů v Evropě

Tato práce se bude zabývat šířením kudlanky nábožné, což může souviset s refugii a šířením po době ledové.

Šíření druhů v Evropě bylo ovlivňováno nejen geografickými podmínkami, ale také oteplováním či ochlazováním klimatu, střídáním období glaciálů a interglaciálů. Podmínky během posledního glaciálního maxima byly naprosto odlišné od podmínek v současném období (Bard 1999).

Během posledních 700 tisíc let ovlivňovaly zalednění arktickými a alpskými ledovci opakující se cykly ochlazování a oteplování klimatu. Během posledních 20-ti až 14-ti tisíc lety dosahoval permafrost až do jižní Francie a Německa. Ledová čepice pokrývala pohoří Pyrenejí i Alp. Temperátní lesy tak ustupovaly a tundra se šířila směrem na jih. Živočichové se stahovali na omezená území malých refugií. Před zhruba 6-ti tisíci lety došlo k oteplení, což mělo za následek expanzi temperátního lesa, která byla následována migrací savců (Weiss & Ferrand 2007).

Nejteplejší část a nejméně proměnlivá část posledního interglaciálu trvala kolem 10-12 tisíc lety (Kukla et al. 2002).

Střídání teplejších a chladnějších období zahrnovalo značné kolísání teplot, čímž mohla být velmi snížena schopnost mnoha druhů přizpůsobovat se měnícím se podmínkám. Měnily se nejen teploty, ale v závislosti na nich i struktura ekosystémů, což se netýká pouze vzdálené minulosti, ale i období přibližně posledních třiceti let. Vzrůstání průměrné teploty má za následek pohyb různých druhů směrem na sever a do vyšších poloh. Globální oteplování tak může ovlivňovat hlavně druhy citlivé na teplotu, jako například vážky nebo motýly, nebo hmyz označovaný za škůdce, který by tak mohl zvýšit svoji početnost (Feehan et al. 2008).

Distribuci rostlin i živočichů silně ovlivňovala přítomnost ledovce v Alpách a Skandinávii. Rozšíření permafrostu a tundry způsobovalo snižování hladiny moře a v oblasti Středomoří se tak vytvářely pevninské mosty (Weiss & Ferrand 2007).

Během posledního zalednění Evropy se vyskytovaly temperátní druhy v refugiích v oblasti Středomoří, jak dokazují paleoekologické a molekulární nálezy (Weiss & Ferrand 2007).

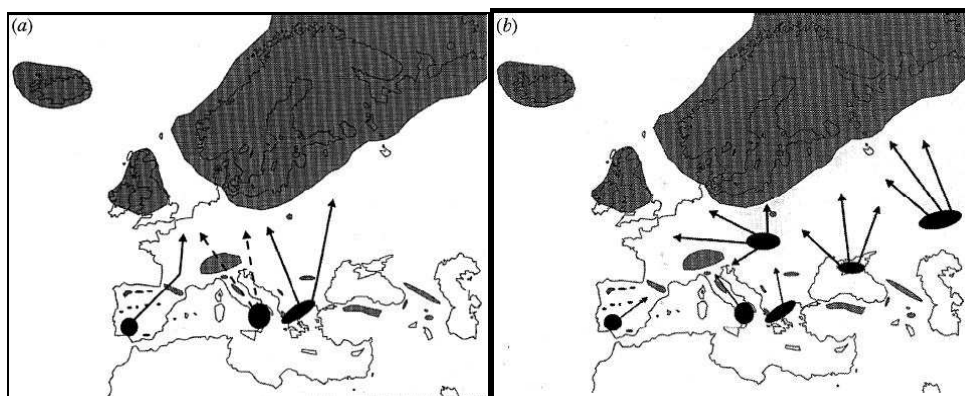
Jednou z teorií je, že během kvartéru, kdy se střídaly glaciály s interglaciály, se druhy musely stáhnout na jih do refugií a v případě oteplení pak rekolonizovaly odledněné oblasti. Tradiční model šíření druhů předpokládá, že hlavní evropská refugia

byla tři: jihozápad Ibérie (odkud se druhy šířily západním směrem), jižní Itálie (šíření západně i východně) a jih Balkánu zahrnující ještě oblast Řecka a Turecka (šíření východním směrem) (obr 2). Hovoří se i o několika možných, zatím stále neidentifikovatelných, kryptických severněji položených refugiích. Další malá refugia předpokládá hlavně výzkum malých evropských savců založený na molekulárních studiích (obr. 3) (Bilton et al. 1998, Weiss & Ferrand 2007).

Saranče *Ch. parallelus* se do střední Evropy rozšířilo z refugia na Balkánu. Iberský a italský genom byl zřejmě blokován Alpami a Pyrenejemi. Ježek *E. europaeus* se šířil zřejmě ze všech tří refugií a evropská pohoří pro něj nepředstavovala větší překážku. Pro medvěda *U. arctos* zřejmě představovaly překážku Alpy a proto se rozšířil po Evropě z Iberského poloostrova a Karpat (obr. 2) (Taberlet 1998, Hewitt 1999, Hewitt 2001).



Obrázek 2: Tři příklady postglaciální kolonizace druhů v Evropě. Zleva *Chorthippus parallelus*, *Erinaceus* spp a *Ursus arctos*. Převzato z Hewitt 2001.



Obrázek 3: Šíření druhů (a) Tradiční model. (b) Model šíření malých savců. Šedivá plocha představuje rozšíření ledovce. Černé body značí refugia a šipky možnosti šíření. (Podle Biltona 1998)

Živočichové byli samozřejmě vázáni na expanzi rostlin jako na svou potravu. Například hmyz, který se živil trávami a bylinami, které se rychleji a lépe šíří, se rozšiřoval rychleji než ty druhy, které byly závislé na dřevinách. Většina druhů je více či méně závislá na nějakém jiném druhu a tak kopíruje rozšíření svého zdroje (Hewitt 1999).

U většiny výše zmíněných druhů převládá baltánská linie, kterou následuje iberská a nakonec je italská (Lunt et al. 1997).

Migrace populací, ať už z nebo do refugií, vytváří prostor pro speciaci a vznik poddruhů v Evropě. Migrace závisí na ekologických podmínkách prostředí a jejich schopnosti disperze. Různé vzory distribuce a stupeň diverzifikace mezi liniemi vznikaly právě izolací druhu v různých refugiích (Dapporto 2009).

3. Materiál a metodika

3.1 Materiál

Pro molekulární analýzy bylo použito 107 jedinců druhu *Mantis religiosa* z 51 lokalit na území ČR i v zahraničí (viz tabulka 1, obr. 4 a 5). Dále bylo použito šest taxonů, sloužících jako outgroups, a to *Iris* sp. a *Hieroduellia* sp. Vzorky pocházejí vždy z odchytu z volné přírody. Ve většině případů byl odebrán pouze tkáňový vzorek, zpravidla se jednalo o část střední či zadní končetiny.

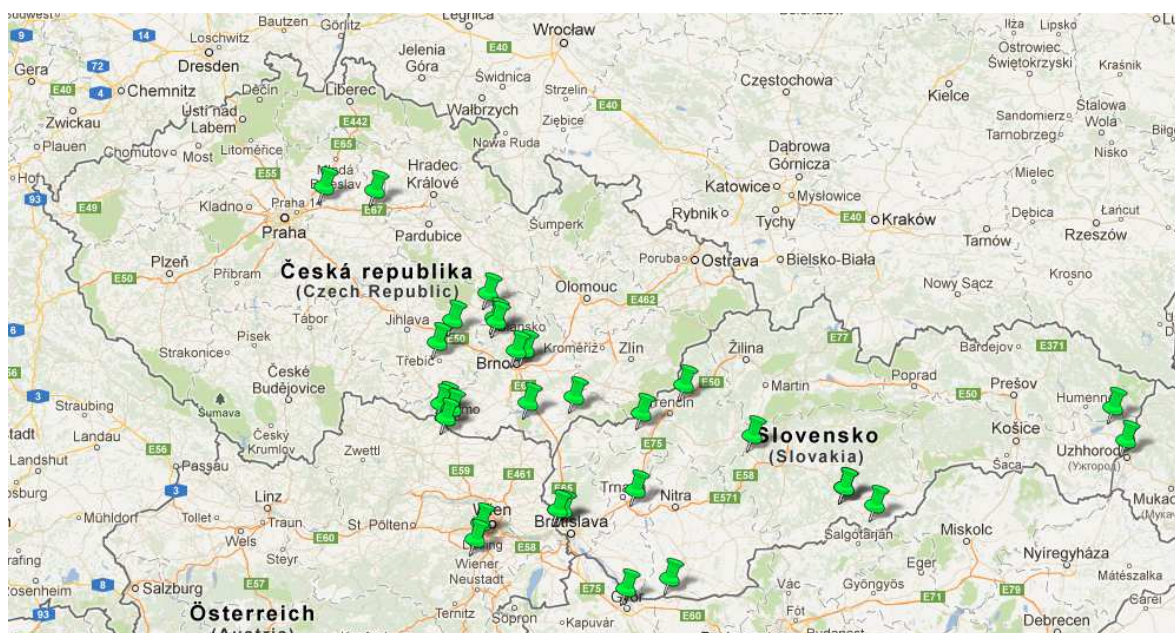
Odchycené exempláře, příp. tkáňové vzorky, byly ihned po sběru zafixovány v 96% etanolu.

Kód lokality	Stát	Oblast	Kód jedince
M042	Czech Republic	Přerov nad Labem	M042_1
M042	Czech Republic	Přerov nad Labem	M042_2
M042	Czech Republic	Přerov nad Labem	M042_3
M043	Czech Republic	Brno	M043_1
M044	Czech Republic	Švařec	M044_1
M044	Czech Republic	Švařec	M044_2
M044	Czech Republic	Švařec	M044_3
M044	Czech Republic	Švařec	M044_4
M045	Czech Republic	Žehuň	M045_1
M046	Czech Republic	Tišňov	M046_1
M046	Czech Republic	Tišňov	M046_2
M047	Bulgaria	Natur reservation Ropotamo	M047_1
M048	Ukraine	Kiev	M048_1
M049	Czech Republic	Velké Meziříčí	M049_1
M050	Slovakia	Lučenec	M050_1
M089	Austria	Baden bei Wien	M089_1
M090	Austria	Brunn am Gebirge	M090_1
M091	Czech Republic	Hodonín - Pánov	M091_1
M092	Czech Republic	Hodonín - Pánov	M092_1
M093	Czech Republic	Podyjí	M093_1
M094	Czech Republic	Tišňov - Květnice	M094_1
M095	Czech Republic	Tišňov - Květnice	M095_1
M096	Czech Republic	Tišňov - Květnice	M096_1
M097	Czech Republic	Žehuň	M097_1
M097	Czech Republic	Žehuň	M097_2
M097	Czech Republic	Žehuň	M097_3
M097	Czech Republic	Žehuň	M097_4
M097	Czech Republic	Žehuň	M097_5
M097	Czech Republic	Žehuň	M097_6
M097	Czech Republic	Žehuň	M097_7
M097	Czech Republic	Žehuň	M097_8
M097	Czech Republic	Žehuň	M097_9
M097	Czech Republic	Žehuň	M097_10

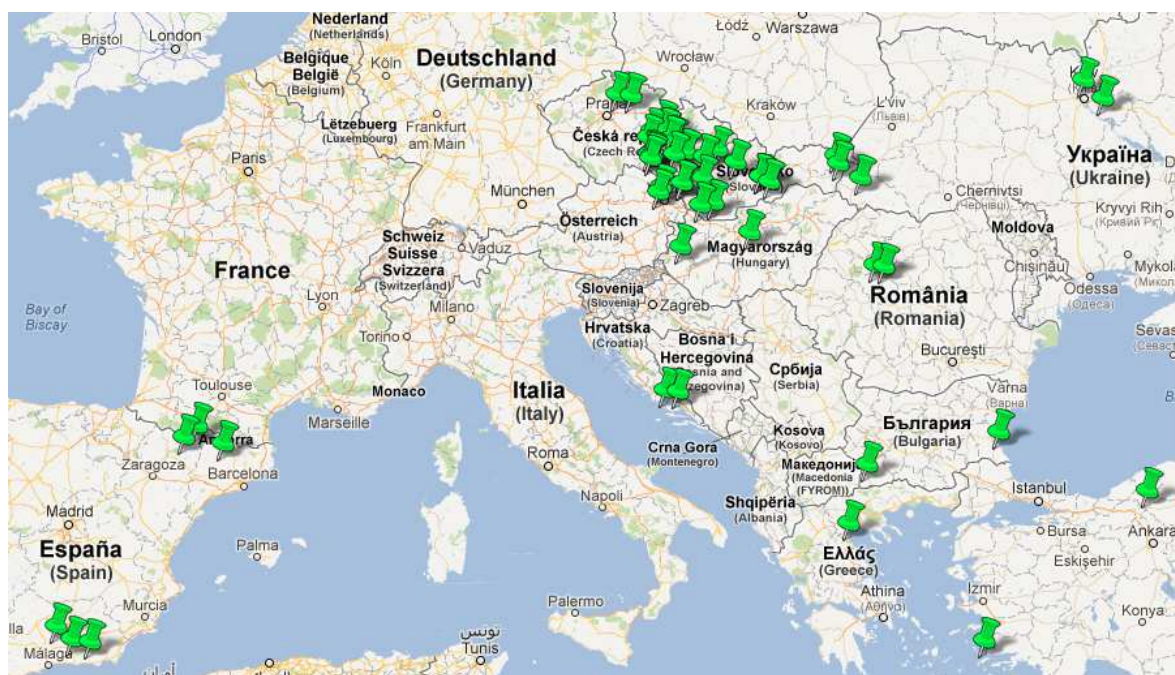
M097	Czech Republic	Žehuň	M097_11
M097	Czech Republic	Žehuň	M097_12
M098	Croatia	Brač	M098_1
M098	Croatia	Brač	M098_2
M098	Croatia	Brač	M098_3
M098	Croatia	Brač	M098_4
*I099	Spain	En Barnugo de Beznar, Andalusia	*I099_1
*I100	Spain	Berja	*I100_1
M101	Spain	Rio Genil Guear - Sierra	M101_1
M164	Spain	El Grado env.	M164_1
M170	Spain	Noales env.	M170_1
M174	Spain	Solsona env.	M174_1
M177	Czech Republic	Brno-Slatina	M177_1
M178	Hungary	Kunpeszér env.	M178_1
M179	Hungary	Kunpeszér env.	M179_1
M179	Hungary	Kunpeszér env.	M179_2
M179	Hungary	Kunpeszér env.	M179_3
M180	Hungary	Kunpeszér env.	M180_1
M180	Hungary	Kunpeszér env.	M180_2
M181	Ukraine	Kovalyn env. (5 km SW from vill.)	M181_1
M182	Croatia	Sumartin env.	M182_1
M182	Croatia	Sumartin env.	M182_2
M183	Greece	Platamonas env.	M183_1
M183	Greece	Platamonas env.	M183_2
M183	Greece	Platamonas env.	M183_3
M183	Greece	Platamonas env.	M183_4
M183	Greece	Platamonas env.	M183_5
M183	Greece	Platamonas env.	M183_6
M183	Greece	Platamonas env.	M183_7
M183	Greece	Platamonas env.	M183_8
M183	Greece	Platamonas env.	M183_9
M183	Greece	Platamonas env.	M183_10
M183	Greece	Platamonas env.	M183_11
M184	Czech Republic	Havraníky	M184_1
M184	Czech Republic	Havraníky	M184_2
M184	Czech Republic	Havraníky	M184_3
M184	Czech Republic	Havraníky	M184_4
M185	Austria	Retz - Altenbergen	M185_1
M186	Czech Republic	Šobes	M186_1
M186	Czech Republic	Šobes	M186_2
M187	Czech Republic	Pálava	M187_1
M188	Czech Republic	Velké Meziříčí	M188_1
M188	Czech Republic	Velké Meziříčí	M188_2
M189	Czech Republic	Brno	M189_1
M189	Czech Republic	Brno	M189_2
M190	Czech Republic	Třebíč	M190_1
M191	Czech Republic	Brno	M191_1
M191	Czech Republic	Brno	M191_2
M192	Slovakia	Devínská Kobyla	M192_1
*I193	Bulgaria	Damyanica	*I193_1
M193	Bulgaria	Damyanica	M193_2
*I193	Bulgaria	Damyanica	*I193_3

*I194	Greece	Tigaki	*I194_1
M195	Slovakia	Kosorín	M195_1
M195	Slovakia	Kosorín	M195_2
M196	Slovakia	Bratislava - Dúbravka	M196_1
M197	Romania	Ciuguzel	M197_1
M197	Romania	Ciuguzel	M197_2
M197	Romania	Ciuguzel	M197_3
M198	Romania	Rimet	M198_1
M198	Romania	Rimet	M198_2
M198	Romania	Rimet	M198_3
M199	Turkey	Kuzdere	M199_1
M200	Slovakia	Horný Čepceň	M200_1
M201	Slovakia	Zemplínská Šírava	M201_1
M202	Slovakia	Lučenec	M202_1
M203	Slovakia	Hajnáčka	M203_1
M204	Slovakia	Nová Stráž	M204_1
M205	Slovakia	Dubnica nad Váhom	M205_1
M206	Hungary	Zalaszentmihály	M206_1
M207	Hungary	Győr	M207_1
*H208	Ukraine	Simeiz, Crimea	*H208_1
M209	Ukraine	Uzhorod	M209_1
M210	Slovakia	Bzince pod Javorinkou	M210_1
M211	Ukraine	Irshava	M211_1
M212	Slovakia	Abrod	M212_1
M213	Hungary	Örkeny	M213_1
M214	Czech Republic	Ječmeniště	M214_1
M215	Czech Republic	Grygov	M215_1
M216	Czech Republic	Litovelské Pomoraví	M216_1
M217	Czech Republic	Velké Meziříčí	M217_1

Tabulka 1: Seznam lokalit kudlanky nábožné (*Mantis religiosa*). Hvězdičkou (*) označeny outgroups.



Obrázek 4: Mapa lokalit kudlanky nábožné odchycené v rámci ČR a použité v této práci (vychází z tabulky 1).



Obrázek 5: Mapa lokalit kudlanky nábožné odchycené v rámci Evropy a použité pro tuto práci (vychází z tabulky 1).

3.2 Metodika

3.2.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena z části končetiny, zpravidla z chodidla a holeně nebo jiné části těla, například z křídla. Všechny vzorky byly uloženy v 96% etanolu v mrazícím boxu při teplotě -20°C . Končetina byla odebrána preparačními pinzetami sterilizovanými lihem a plamenem vždy před a po odběru.

Tkáň byla poté osušena na filtračním papíře, následně pomocí sterilních pinzet rozlámána na menší části a vložena do 2 ml mikrozkušavky. Poté byla zkumavka ponechána otevřená při 50°C po dobu 5 minut, aby se odpařil zbytkový etanol. DNA byla extrahována podle protokolu komerčně dodávané izolační sady Qiagen DNAeasyR Tissue Kit (Qiagen). Pro lepší lyzi tvrdších částí byly vzorky nechány v topném bloku přes noc při teplotě 56°C .

Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla poté změřena a ověřena pomocí spektrofotometru NanoDropRND-100.

Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20°C .

3.2.2 Mitochondriální geny

3.2.2.1 Polymerázová reakce (PCR)

Pro diplomovou práci byly použity úseky tří mitochondriálních genů a to cytochromoxidázy I (COI), cytochromoxidázy II (COII) a cytochromu b (cytb). Úseky těchto genů u druhu *Mantis religiosa* a druhů použitých jako outgroup byly amplifikovány pomocí primerů uvedených v tabulce 2.

Gen	Název primeru	Orientace F/R	Sekvence	Zdroj
COI	C1-J-2183 (Jerry)	Forward	5' CAACATTTATTTTGATTTTGG 3'	Simon et al. 1994
	L2-N-3014 (Pat)	Reverse	5' TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA 3'	Simon et al. 1994
COII	COII Flue	Forward	5' TCTAATATGGCAGATTAGTGC 3'	Svenson & Whiting 2004
	COII 9b	Reverse	5' GTACTTGCTTTCAGTCATCTW 3'	Svenson & Whiting 2004
Cyt b	CP1	Forward	5' GATGATGAAATTTTGGATC3'	Harry et al. 1998
	CN-B	Reverse	5' ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT3'	Jermiin & Crozier 1994

Tabulka 2: Přehled primerů použitých pro amplifikace genů.

Reakční směs byla připravována do celkového objemu 25 μ l na vzorek (přesné složení reakční směsi uvedeno v tabulce 3). Pro PRC reakci byla použita komerční reakční směs PPP Master Mix dodávaný společností Top-Bio, s.r.o. Tato směs obsahuje všechny potřebné složky (dNTP, Taq polymeráza, reakční pufr s MgCl₂, barviva a stabilizátory) s výjimkou primerů. Součástí balení je také 1,5 ml mikrozkušavka s PCR H₂O. V některých případech by použit také PPP Master Mix bez MgCl₂ (Top-Bio) a do reakce přidán MgCl₂ (25nM) (součást balení). Složení této směsi je uvedeno v tabulce 4.

Amplifikace požadovaných úseků DNA probíhala v termocykleru C100TM Thermal Cycler v laboratoři oddělení Entomologie. Programy pro amplifikaci genů jsou uvedeny v tabulkách 5, 6 a 7.

Chemikálie	Množství (μ l)
PPP Master Mix	12,5
Forward (10 pmol/ μ l)	1
Reverse (10 pmol/ μ l)	1
PCR H ₂ O	9,5
DNA (5-10 ng/ μ l)	1
Celkový objem	25

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR (vztaženo na jednu reakci)

Chemikálie	Množství (μl)
PPP Master Mix	12,5
MgCl ₂	2,5
Forward (10 pmol/μl)	1
Reverse (10 pmol/μl)	1
PCR H ₂ O	7
DNA (5-10 ng/μl)	1
Celkový objem	25

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR s MgCl₂ (vztaženo na jednu reakci)

Poznámka: Pokud selhalo použití 1 μl DNA, bylo množství zvýšeno až na 3 μl na reakci. Příslušně pak bylo upraveno i množství PCR H₂O.

COI	Krok	Počet opakování	Teplota	Čas
1.	Počáteční denaturace	1x	95°C	5 min
2.	Denaturace	40x	95°C	30s
3.	Nasedání primerů		50°C	40s
4.	Prodlužování		72°C	2 min
5.	Konečné prodlužování	1x	72°C	10 min
6.	Chlazení	1x	4°C	Forever

Tabulka 5: PCR program pro amplifikaci genů COI.

COII	Krok	Počet opakování	Teplota	Čas
1.	Počáteční denaturace	1x	95°C	12 min
2.	Denaturace	40x	94°C	1 min
3.	Nasedání primerů		52°C	1 min
4.	Prodlužování		72°C	1 min 15s
5.	Konečné prodlužování	1x	72°C	1 min
6.	Chlazení	1x	4°C	Forever

Tabulka 6: PCR program pro amplifikaci genů COII.

cytb	Krok	Počet opakování	Teplota	Čas
1.	Počáteční denaturace	1x	92°C	5 min
2.	Denaturace	40x	92°C	1 min
3.	Nasedání primerů		46°C	30s
4.	Prodlužování		72°C	2 min
5.	Konečné prodlužování	1x	72°C	10 min
6.	Chlazení	1x	12°C	Forever

Tabulky 7: PCR program pro amplifikaci genů cyt b.

3.2.2.2 Kontrola správného průběhu PCR

Pomocí elektroforézy byla prováděna kontrola kvality a přibližné délky DNA. Na 1% agarozový gel smíchaný s optimálním množstvím ethidium bromidu (odpovídající objemu gelu), bylo naneseno 5 μ l PCR produktu od každého vzorku společně s 2 μ l délkovým standardem DNA (GeneRulerTM 100bp DNA Ladder Fermentas). Elektroforéza probíhala po dobu cca 30 – 45 min. Nastavena byla na hodnoty 400mA a 100V. Po skončení elektroforézy byla provedena kontrola pod UV osvětlením.

Vzorky, u kterých elektroforéza proběhla úspěšně, byly purifikovány pomocí soupravy QiaquickR PCR Purification Kit (Qiagen) dle protokolu dodávaného výrobcem, aby byly odstraněny přebytečné pufrý, enzymy, barviva a nukleotidy. Případně byly vzorky rovnou zaslány k purifikaci do firmy Macrogen, a tam pak následně i osekvenovány.

3.2.2.3 Příprava na sekvenci

Pomocí spektrofotometru NanoDropRND-100 byla ověřena koncentrace a kvalita přečištěné DNA. Pokud přístroj ukazoval hodnoty nad 20 ng. μ l⁻¹, byly vzorky použity k dalšímu zpracování.

Následně byla připravena směs pro sekvenaci o celkovém objemu 14 μ l na vzorek, který zahrnoval optimální množství amplifikované purifikované DNA (které bylo vypočítáno z koncentrace dle návodu na <http://web.natur.cuni.cz/~seqlab/>), 0,32 μ l specifického primeru forward nebo reverse a to vše bylo doplněno ddH₂O do objemu 14 μ l. Takto připravené vzorky byly předány na sekvence do laboratoře sekvence PřF UK (sekvenátor 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems), kde byly provedeny srážecí a sekvenční reakce (kit BigDyeR Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems).

V některých případech byla pro sekvenaci využita také korejská firma Macrogen, kam se odeslala purifikovaná DNA s odpovídajícími primery (nebo se přímo odeslaly vzorky určené k purifikaci). Spolu s platíčkem, ve kterém bylo veškeré množství purifikovaných PCR produktu, bylo odesláno také odpovídající množství specifických primerů (na 5 vzorků/ 20 μ l primeru). Každý vzorek a každý primer byl

v samostatné zkumavce. V laboratořích firmy MacroGen pak probírala sekvenace na přístroji 3730XL DNA sequencer (Applied Biosystems).

3.2.2.4 Editace sekvencí

Požadovaný úsek zkoumaného genu byl osekvenován zpočátku v obou směrech. Posléze bylo zjištěno, že sekvence jsou velmi kvalitní a stačí sekvenovat pouze z jednoho směru, za cenu minimální ztráty variabilních míst. Pro cytochrom oxidázu byl použit primer PAT, pro cytochrom oxidázu II primer COII 9b a pro cytochrom b primer CP-1.

Ke kontrole chromatogramu, sekvencí a následného složení forward a otočené reverse sekvence (u několika prvních vzorků) byl použit program BioEdit (Hall 1999). Sekvence byly následně alignovány v programu Clustal W (Thompson et al. 1994), který je součástí programu BioEdit. Následně byly všechny sekvence zkráceny na obou koncích tak, aby začínaly a končily ve stejné pozici a byl přitom zachován čtecí rámec.

Upravený dataset byl zkontrolován pomocí programu MEGA 4 (Tamura 2007), zda sekvence neobsahují stop-kodóny. Byl použit genetický kód Invertebrate Mitochondrial pro COI a COII a Flatworm Mitochondrial pro cyt b.

Pokud se nějaká sekvence výrazněji lišila od ostatních, byl použit The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) - databáze Nucleotide collection (nr/nt) pro odhalení taxonomické příslušnosti. Ve všech případech se jednalo o jiné rody z řádu Mantodea, které byly následně do analýz zařazeny jako outgroup.

Finální data pro další zpracování byla uložena ve formátu fasta.

Spojování sekvencí pro tvorbu konkaténátů bylo provedeno manuálně v textovém editoru. Poté byly opětovně otevřeny v programu BioEdit a následně vyexportovány v požadovaném vstupním formátu vhodném pro další analýzy.

3.2.2.5 Analýza dat

Výsledné stromy vycházející z analýz byly vizualizovány v programu TreeView 1.6.6 (Page 1996) a následně graficky upraveny v programu CorelDraw 12.0.

3.2.2.5.1 Bayesovská analýza (BA)

Bayesovská metoda je způsobem rekonstrukce stromů, který prohledává krajinu možných stromů podle algoritmu Markov Chain Monte Carlo (MCMC) (Yang & Rannala 1997). Tímto způsobem získává posteriorní pravděpodobnosti pro každé větvení stromu. Bayesovská statistika přiřazuje apriori pravděpodobnost každé možné topologii.

Datasety byly analyzovány pomocí programu MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Analýzy probíhaly na serveru Bioportal (<http://www.bioportal.uio.no>). Byl použit evoluční model *lset nst=6 rates= invgamma* počítající s různými mírami rychlosti záměn nukleotidů podél sekvence a pravděpodobnostní distribucí gamma.

Analýzy byly pomocí příkazu *stoprule=yes stopval=0.01* automaticky ukončeny, pokud standardní odchylka obou souběžně probíhajících běhů byla nižší než 1%. Po doběhnutí analýzy byly odstraněny počáteční neustálené stromy (asi 25% z celkového počtu stromů).

Počet generací se u každé analýzy lišil, a proto je uvedený u každého stromu.

3.2.2.5.2 Maximum likelihood (ML)

Tato metoda výpočtu fylogenetického stromu vybírá stromy na základě maximální pravděpodobnosti. Ze vstupních dat posoudí pravděpodobnost správnosti zvolené topologie. Její správnost ověřilo bootstrapování, které je k této analýze připojeno (Felsenstein 1985). Pro tuto analýzu byl vybrán program RAxML 7.2.6 (Stamatakis 2006), který běžel na výpočetním klastru darwin.natur.cuni.cz. Byl zvolen model general time-reversible (GTR) s gamma distribucí. Pro „bootstrap resampling technique“ bylo určeno 1000 replikátů.

3.2.2.5.3 Haplotypová síť

Pro vizualizaci vztahů mezi sekvencemi jednotlivých datasetů byl použit program Network 4.600 (<http://www.fluxus-engineering.com>). Pro vytvoření haplotypové sítě byla zvolena metoda Median-Joining (Bandelt et al. 1999). Parametr epsilon byl nastaven na nulu. Následně byla provedena MP kalkulace, která výslednou síť zjednoduší odstraněním nepotřebných vektorů a linek. Pro zjištění počtu haplotypu byl použit program FaBox (<http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/>, Villesen 2007).

3.2.3 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou krátké tandemově se opakující jednoduché sekvenční motivy o délce 2-6 bp, charakterizované vysokou mutační rychlostí. Navzájem se liší svou délkou, a proto mohou být snadno separovány fragmentační analýzou. Jejich výhodami je vysoká proměnlivost, velká početnost a rozmístění po celém genomu, kodominantnost alel a možnost jejich přesné identifikace a také jednoduchost analýzy (Zima et al., 2004).

Populačně genetické studie na kudlankách nábožných a ani na žádných jiných druzích řádu Mantodea nejsou příliš časté. Zatím byl opublikován jenom výzkum prováděný na australském druhu *Ciulfina rentzi* (Attard et al., 2009), kdy byly vyvinuty mikrosatelitové lokusy za účelem studia populační charakteristiky druhu (paternita, populační struktura atd.).

3.2.3.1 Výběr primerů

Navržení mikrosatelitových primerů bylo zadáno firmě GenoScreen Company (Lille, Francie). K tomu bylo potřeba DNA s vysokou koncentrací a o vysoké kvalitě. Byl vybrán vzorek z NP Podyjí, Havranické vřešoviště, 1.v. 2010 o koncentraci 10ng/ μ l.

Z téměř pětiset navrhnutých mikrosatelitů bylo vybráno pouze 95 jako nejlepších. Na základě celkové délky produktu a mikrosatelitového motivu byly na testování vybrány primery ohraničující úseky s nejdelším opakováním dvou až pěti bázevých motivů (jednotlivé délky repetice se pohybovaly mezi 12 a 96 bázemi). Pro prvotní testování bylo použito celkem 33 párů primerů (viz tabulka 8).

Seq. Code	Primer Left Sequence	Primer Right Sequence	Motif
GCEF3F	TTGAAGTTGCGTAACAAGTTAACAG	TGTTGCTCTGTCCAATGAGG	[caa] ₁₀
GBVY30	TTCCGGACTTCGAACATACC	CCCTAGGAGACTTTGCCCTC	[ca] ₉
GBRRAH	CTTCTCCTTCTCCTTCTTCTGC	ATCCAGTGATTCCGTTCTTG	[ctt] ₁₄
GBQZDI	TCCGTTTACGACTGTCCGAT	GGGAAGGTGGACGTACATTG	[ac] ₁₃
GBN3QS	GCAGGTTTTCTCCAGTCAGC	TCCTCCTTCTCCTTCTTCTCC	[agg] ₇
GBJKZT	CTTTACATTTACGGGCCAA	AAGAAAATAGAACAAAGATGCGGA	[cact] ₂₄
GBIJ33	TGACCGAGAACTCACCTCT	TGAGTTTTTACCGCATACCA	[atg] ₁₂
GBHVRL	CGAGTGGTAAGGGAGGATGA	CGTCTGTCTTACGCGTGTG	[tg] ₆
GBDP60	GTGTCTCTCCCTCCCTCCTC	CCGTACCCTCCTACCTCCTC	[tg] ₄₁
GB6LI5	TCCCCTAACACCAAGGTAGC	GGCGACTGAGGTCCAACT	[gga] ₁₀
GB5D3H	CGACGAACTTTACTCCAGCC	AAATGTGAGACCGGAACAGG	[ttc] ₁₅
GB1ZMO	TTGGAGTTTCAGTCAGGTCAGA	CCAAAACGTTAAAGAGTGCTTG	[ca] ₁₇
GB1W6P	GTTGAGCGCCCTTATACACA	TTGATGCCTTCAAAGTTGCT	[cat] ₁₈
GAWORG	GGTGCCGTACGTTAAGATT	TTTTCCCTACCCAACGTTTA	[gt] ₂₆
GAT18Q	ATTCCAATCTAGTTCGAAAACA	TGACCTAACTTTTACGGTACATGC	[tg] ₁₈
GARNV2	CATCGACCGAACATATGGAA	AGGCGTCTATTGGTCGAGTA	[ac] ₁₉
GAISK	TTCATTGGACATACAGCCA	ACCATGGAAGGAACACGCC	[ctt] ₂₀
GAHM3I	CCAGGCAAAATAGTGGTTGCT	TCCTGTTTTACCGGCACTTC	[acg] ₇
GAGQ3Y	TACGGAGGCTATGGAGGAGA	GGTTAACCGCGAACAAAATG	[aggag] ₁₀
GA92VQ	GTCGAGATCGCACTGGAAAT	CACACACGACGACTACTTACA	[tg] ₁₄
GA4R63	ACAAGACGGAGAAGGAGACG	AAGTCTCCGGGCCATCTATT	[gaa] ₉
c96_2	AGTAAGACGCAATTGTGGGC	GGGGTTTTCCCTTATTCTGA	[gtt] ₈
c729_2	TTCCAGTGATGTTCTTGATTC	TAAAGACTACGCGTTGCGAA	[gat] ₉
c550_2	TGCCTACTGAGTGTGAGCCA	CCAGCACGCACTTACAACA	[tct] ₂₀
c519_2	TGTTGAAATGGTATCAGAGCG	GCTTGCCTTGTGAGTTCTCA	[ca] ₁₈
c365_4	CCCACAAAATGGGTCAATC	CGTGTAGAATCACTTCCACGG	[tct] ₂₀
c321_2	TCATTGAACTAAGGCACATTTT	CCCCTCAATACTCTTCCGGT	[ttc] ₁₄
c254_2	CGTAAGCACATTACGGACG	GACTTAACGTTGGAGGACGG	[gtt] ₁₂
c189_2	GGTGCATAAGGCTGATCGTT	CTCTTCTGCGTCGTTCTGATT	[gag] ₁₆
c181_5	GCAGTCGTTAGCGTATCGTG	CTACGGTAACCAACCAAC	[ttggg] ₉
c140_2	TCGCCTTGTCTATCTACCTTTT	CTGGCTGCACTTTTGTGGA	[tg] ₁₀
c136_5	GTTGCGACTAGCAATCACGA	TCCCATAAAGGTTGATACCAAGT	[acc] ₁₆
c11_2	AGAACCAGCCAGATGCTACG	GGCCTATCTGGTCTGTCTTGA	[cat] ₁₀

Tabulka 8: Zkoušené primery na mikrosatelity

Primery uvedené v tabulce 8 prošly zkouškami. Během nich a výběrů primerů byly zároveň vyzkoušeny i dva kity pro polymerázové reakce a to QIAGEN Multiplex PCR Kit a QIAGEN Type-It Microsatellite PCR Kit, aby bylo možno určit, který je pro tyto reakce vhodnější. Zkoušky kitů probíhaly na několika vzorcích vybraných tak, aby zastupovaly vzájemně dostatečně vzdálené lokality a zahrnovaly i potencionálně velmi příbuzné jedince ze stejné lokality. Konkrétně se jednalo o dva vzorky z Čech (oba z lokality Přerov nad Labem), dva z Moravy (oba Tišnov), dva z Chorvatska (oba Brač) a dva z Maďarska (oba z lokality Kunpeszér). Po sérii zkoušek byl přidán ještě roztok Q solution, kvůli otestování, zda neumožňuje získat lepší signál. Jako nejlepší byl vyhodnocen QIAGEN Multiplex PCR Kit s přidáním Q solution.

Dalším parametrem, s kterým bylo třeba provést několik testů, byla teplota nasedání primerů. Jako výchozí byla nastavena teplota 60°C, která ovšem pro mikrosatelitové lokusy u *M. religiosa* nebyla zcela vyhovující. Proto byl použit teplotní gradient v rozsahu 55°C až 65°C a na několik vzorcích bylo otestováno, která teplota je nejvhodnější. Na základě vyhodnocení výsledků pomocí elektroforézy byla jako vhodná stanovena teplota 61°C, která byla dále používána.

Každý test probíhal na několika vzorcích za použití obou kitů, aby mohlo být stanoveno optimální složení směsi pro PCR a optimální nastavení teploty nasedání primerů. Pro první testy bylo vybráno několik primerů a následně byly otestovány všechny. Tak bylo vybráno 15 funkčních párů a 13 z nich bylo následně objednáno k označení fluorescenčními barvami (tabulka 9).

Výsledné složení směsi a program pro PCR jsou uvedeny dále (viz tabulky 10 a 11).

Seq. Code	Primer Left Sequence	Primer Right Sequence	Objednany F (znaceny)	Objednany R	Motif	Min. PCR product size
GB1W6P_	GTTGAGCGCCCTTATACACA	TTGATGCCTTCAAAGTTGCT	PET - GTT GAG CGC CCT TAT ACA CA	GTT TGA TGC CTT CAA AGT TGC T	[cat] ₁₈	90
GBDP60_	GTGTCTCTCCCTCCCTCCTC	CCGTACCTCCTACCTCCTC	GTGTCTCTCCCTCCCTCCTC	CCGTACCTCCTACCTCCTC	[tg] ₄₁	90
GAGQ3Y_	TACGGAGGCTATGGAGGAGA	GGTTAACC CGGAACAAAATG	6FAM - TAC GGA GGC TAT GGA GGA GA	GTT TGG TTA ACC GCG AAC AAA ATG	[aggag] ₁₀	140
GBVY30_	TTCCGGACTTCGAACATACC	CCCTAGGAGACTTTGCCCTC	TTCCGGACTTCGAACATACC	CCCTAGGAGACTTTGCCCTC	[ca] ₉	140
GB5D3H_	CGACGAACCTTACTCCAGCC	AAATGTGAGACCGGAACAGG	VIC - CGA CGA ACT TTA CTC CAG CC	GTT TAA ATG TGA GAC CGG AAC AGG	[ttc] ₁₅	140
GBIJ33_	TGACCGAGAACTCACCTCT	TGAGTTTTACCGCATACCA	PET - TGA CCG AGA ACT CAC CCT CT	GTT TGA GTT TTC ACC GCA TAC CA	[atg] ₁₂	140
c550_2_	TGCCTACTGAGTGTGAGCCA	CCAGCACGCATTCTACAACA	NED - TGC CTA CTG AGT GTG AGC CA	GTT TCC AGC ACG CAT TCT ACA ACA	[tct] ₂₀	140
GBJKZT_	CTTTACATTTACGGGCCCAA	AAGAAAATAGAACAAGATGCGGA	CTTTACATTTACGGGCCCAA	AAGAAAATAGAACAAGATGCGGA	[cact] ₂₄	140
c181_5_	GCAGTCGTTAGCGTATCGTG	CTACGGTAACCCAACCCAAC	6FAM - GCA GTC GTT AGC GTA TCG TG	GTT TCT ACG GTA ACC CAA CCC AAC	[ttggg] ₉	140
c96_2_	AGTAAGACGCAATTGTGGGC	GGGGTTTCCCCTTATTCTGA	NED - AGT AAG ACG CAA TTG TGG GC	GTT TGG GGT TTC CCC TTA TTC TGA	[gtt] ₈	190
c321_2_	TCATTGAACTAAGGCACATTTT	CCCCTCAATACTCTTCCGGT	PET - TCA TTC GAA CTA AGG CAC ATT TT	GTT TCC CCT CAA TAC TCT TCC GGT	[ttc] ₁₄	190
c136_5_	GTTGCGACTAGCAATCACGA	TCCCATAAAGGTTGATACCAAGT	VIC - GTT GCG ACT AGC AAT CAC GA	GTT TCC CAT AAA GGT TGA TAC CAA GT	[acc] ₁₆	190
GCEF3F_	TTGAAGTTGCGTAACAAGTTAACAG	TGTTGCTCTGTCCAATGAGG	6FAM - TTG AAG TTG CGT AAC AAG TTA ACA G	GTT TGT TGC TCT GTC CAA TGA GG	[caa] ₁₀	240
GAHM3I_	CCAGGCAAATAGTGGTTGCT	TCCTGTTTTACCGGCACTTC	NED - CCA GGC AAA TAG TGG TTG CT	GTT TCC TGT TTT ACC GGC ACT TC	[acg] ₇	240
GBHVRL_	CGAGTGGTAAGGGAGGATGA	CGTCTGTCTTACGCGTGTTG	VIC - CGA GTG GTA AGG GAG GAT GA	GTT TCG TCT GTC TTA CGC GTG TTG	[tg] ₆	240
GBN3QS_	GCAGGTTTTCTCCAGTCAGC	TCCTCCTTCTCCTTCTTCTCC	PET - GCA GGT TTT CTC CAG TCA GC	GTT TCC TCC TTC TCC TTC TTC TCC	[agg] ₇	240
c140_2_	TCGCCTGTCTATCTCTACCTTTT	CTGGCTGCAACTTTTGTGTA	TCGCCTGTCTATCTCTACCTTTT	CTGGCTGCAACTTTTGTGTA	[tg] ₁₀	240

Tabulka 9: Primery vybrané k označení fluorescenčními barvami

3.2.3.2 Polymerázová reakce (PCR)

Reakční směs pro mikrosatelity byla připravována do celkového objemu 11 μ l na vzorek (přesné složení reakční směsi uvedeno v tabulce 10). PCR reakce byly provedeny na Eppendorf Thermal Cykleru.

Pro počáteční testování primerů a vhodnosti programu pro PCR (konkrétně se jednalo o vybrání nejvhodnější teploty pro nasedání primerů) byly vybrány 2-4 vzorky, na kterých bylo testována amplifikace každého lokusu a přítomnost délkového polymorfismu. Jednalo se o dva vzorky pocházející ze stejné lokality a další dva, které byly z lokalit co nejvíce vzdálených od původních dvou a zároveň i od sebe navzájem.

Pro další polymerázovou reakci tak byla stanovena optimální teplota pro nasedání primerů 61°C, která byla následně používána při dalších zkouškách primerů a následně i při vytváření multiplexů. Program použitý pro amplifikaci je uveden v tabulce 11.

Chemikálie	Množství (μ l)
QIAGEN Multiplex PCR Kit	5
Q solution	1
Multiplex primerů	1
RNAse Free Water	3
DNA (7-15 ng/ μ l)	1
Celkový objem	11

Tabulka 10: Složení reakční směsi pro PCR

	Krok	Počet opakování	Teplota	Čas
1.	Počáteční denaturace	1x	95°C	15 min
2.	Denaturace	30x	94°C	30s
3.	Nasedání primerů		61°C	90s
4.	Prodlužování		72°C	30s
5.	Konečné prodlužování	1x	60°C	30s
6.	Chlazení	1x	4°C	End

Tabulka 11: PCR program na amplifikaci mikrosatelitů

3.2.3.3 Kontrola správného průběhu PCR

Pro zjištění správného chodu PCR reakcí, kontrolu amplifikace každého lokusu a přítomnosti délkového polymorfismu byly produkty PCR naneseny na 4% agarosový gel s optimálním množstvím ethidia bromidu, které odpovídalo objemu gelu. Na gel bylo naneseno 5 µl směsi, a to 5 µl produktu PCR promíchaném na kousku parafilmu s 2 µl Loading Dye. Použit byl délkový standard DNA (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Fermentas), pro zjištění délky sledovaného úseku. Elektroforéza probíhala cca 60 – 120 min. při nastavení na hodnoty 400mA a 100V. Po uběhnutí této doby byla provedena kontrola pod UV osvětlením.

Tento krok probíhal pouze v počáteční fázi zkoušení primerů. Při vývoji multiplexů po PCR následovalo přímo odeslání do laboratoře sekvence PřF UK na fragmentační analýzu.

3.2.3.4 Příprava na fragmentační analýzu

Pro přípravu vzorků k odeslání na fragmentační analýzu byla použita destička určená k tomu účelu. Směs se skládala z produktu PCR, délkového standardu (LIZ 500) a 95% formamidu (přesně složení v tabulce 12).

Chemikálie	Množství (µl)
Formamid 95%	9
LIZ 500 (ABI)	0.25
Produkt PCR	1

Tabulka 12: Složení směsi na fragmentační analýzu

Následně byla směs ještě zdenaturována v cykleru Eppendorf Thermal Cykleru, kde byly vzorky zahřáty na 95°C po dobu dvou minut a následně zchlazeny na 5°C na 5 minut.

Poté byla destička odnesena do laboratoře sekvenace PřF UK.

3.2.3.5 Značené primery a sestavování multiplexů

Pro tento krok byly použity fluorescenčně značené primery objednané u Applied Biosystems. Výběr primerů k označení fluorescenční barvičkou probíhal na základě lokusů, které byly správně amplifikované a které případně při kontrole na agarosovém gelu vykazovaly známky polymorfismu. Pro výběr primerů byla důležitým kritériem počet opakování a celková délka mikrosatelitových opakování (Černá & Straka 2012).

Sekvence vybraných primerů byly před označením ještě upraveny dle Brownsteina et al. (1996) a to přidáním sekvence GTTT k 5' konci reverse primeru s A, C nebo G na 5' konci, GTT k primeru s T následovaným A, C a G na 5' konci a GTT k primerům končícím TT následovaným A, C nebo G. Toto opatření má snížit počet genotypových chyb, což má za následek velmi konzistentní úroveň adenylace PCR produktů.

Značené primery (jejich značení je uvedeno v tabulkách 13 a 14) bylo třeba nejprve naředit. Primery byly dodány vysušené (lyofilizované) a jejich množství odpovídalo 10nmol. Všechny byly naředěny na hodnotu 100μmol. Z celkového množství bylo odebrán alikvot 20μl, které byly umístěny do zvláštní mikrozkušavky. Ty byly následně používány do reakcí. Všechny primery byly uchovávány zmražené a jejich manipulace na světle byla omezena na nezbytnou dobu, aby nedošlo k degradaci značení.

Následně bylo třeba všechny značené primery vyzkoušet. Byly použity dva vzorky kudlanky nábožné z Moravy (jednalo se o jedince z lokality poblíž Brna). Postup byl stejný, jako je uvedeno nahoře. Výjimku tvoří primery, které byly do reakce PCR upraveny takto - do zvláštní ependorfy bylo smícháno 0,5 μl reverse primeru a 0,5 μl forwardu primeru. Takto byly smíchány všechny primery a následně použity do reakce už jako směs pro každý primer. Program byl použit stejný, jako je uvedeno v tabulce 11.

Pro další reakci byly použity celkem 4 vzorky (2 z Moravy, 1 z Čech a 1 z Chorvatska). Směs byla použita opět tatáž, pouze primery bylo třeba více zředit. A to následovně: do 48μl ddH₂O bylo přidáno 1μ forwardu a 1 μl reversu. Takto naředěné primery byly použity do směsi na PCR, jak je uvedena v tabulce 10. Do této reakce musely být vzorky naředěné cca 15 μl. Tento ředící postup byl použit proto, aby se

dosáhlo správné koncentrace jednotlivých primerů přidávané do finálních multiplexů (viz tabulka 13 a 14).

Značení - reálné barvy
PET®
NED™
6FAM™
VIC®

Tabulka 13: Reálná barva primerů.

Primery
GB1W6P_F
GBIJ33_F
c321_2_F
GBN3QS_F
GAGQ3Y_F
c181_5_F
GCEF3F_F
GB5D3H_F
c136_5_F
GBHVRL_F
c550_2_F
c96_2_F
GAHM3I_F

Tabulka 14 : Značení primerů odpovídající jejich reálné barvě.

3.2.3.6 Fragmentační analýza

Výsledky byly editovány v programu Soft Genetics GeneMarker Version 2.2.0., ve kterém bylo zjištěno, zda primery nasedají správně a zda mají správnou koncentraci (viz kapitola 3.2.3.5).

Primery byly dále ředěny dle potřeby a dle výsledků předběžných analýz rozděleny do dvou multiplexů. Viz tabulky 15 a 16.

Multiplex 1	množství v μl (reverse + forward)
GBIJ33_F	1 + 1
GAGQ3Y_F	2 + 2
GCEF3F_F	1,5 + 1,5
GBHVRL_F	0,5 + 0,5
c550_2_F	1,5 + 1,5
dd H ₂ O	87
celkový objem	100

Tabulka 15: Složení a ředění multiplexu 1.

Multiplex 2	množství v μl (reverse + forward)
GB1W6P_F	1 + 1
GBN3QS_F	1 + 1
c181_5_F	1 + 1
c96_2_F	1 + 1
dd H ₂ O	92
celkový objem	100

Tabulka 16: Složení a ředění multiplexu 2.

Postup práce s multiplexy se neliší od metodiky popsané výše.

3.2.3.7 Analýza mikrosatelitových dat

V programu GeneMarker 2.2.0 (<http://www.softgenetics.com>) byly vytvořeny panely pro oba multiplexy a postupně odečteny délky alel jednotlivých lokusů. Základní stanovení charakteristiky všech lokusů, množství alel na jednotlivých lokusech, očekávané a pozorované heterozygotnosti, Hardyho-Weinbergovy rovnováhy a frekvence nulových alel byly provedeny v programu Cervus (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007).

4. Výsledky

4.1 Charakter vstupních dat

Amplifikací vybraných úseků pomocí primerů uvedených v tabulce 2 byly získány částečné sekvence tří genů.

Mitochondriální gen pro cytochrom oxidázu I (COI) o konečné délce 784 bp byl osekvenován u 104 jedinců zkoumaného druhu a u pěti jedinců použitých jako outgroups. U čtyř dalších jedinců druhu *M. religiosa* se nepodařilo získat čitelné sekvence.

Mitochondriální gen pro cytochrom oxidázu II (COII) o konečné délce 720 bp byl osekvenován u 107 jedinců zkoumaného druhu a u šesti jedinců vybraných jako outgroups.

Sekvence mitochondriálního genu pro cytochrom b (cytb) o konečné délce 684 bp byl osekvenován u 93 jedinců zkoumaného druhu a pěti jedinců využitých jako outgroup. U tohoto genu se nepovedlo získat přijatelné sekvence od čtrnácti jedinců.

Dále byly vytvořeny konkatenáty z jednotlivých genů a to vždy takovým způsobem, aby byli v konkatenátu zahrnuti pouze jedinci, u kterých se podařilo získat sekvence konkatenovaných genů. To znamená, že pokud se u jednoho ze zahrnutých genů nepodařilo získat čitelné sekvence, byl tento jedinec z konkatenátu vyřazen.

Základní informace o získaných datasetech jsou uvedeny v tabulce 17.

datový soubor	počet OTU	z toho outgroups	Počet znaků			p-distance interval/průměr (v %) (bez outgroups)
			celkový	variabilních (bez outgroups)	parsimonně informativních (bez outgroups)	
COI	109	5	784	43	23	0-2,6/ 0,5
COII	113	6	720	57	34	0-3,7/ 0,5
cyt B	98	5	684	36	27	0-3,7/ 0,4
COI + CytB	96	3	1468	69	47	-
COI + COII	109	5	1504	99	57	-
COII + CytB	96	3	1404	83	58	-
COI + COII + CytB	95	2	2188	116	78	-

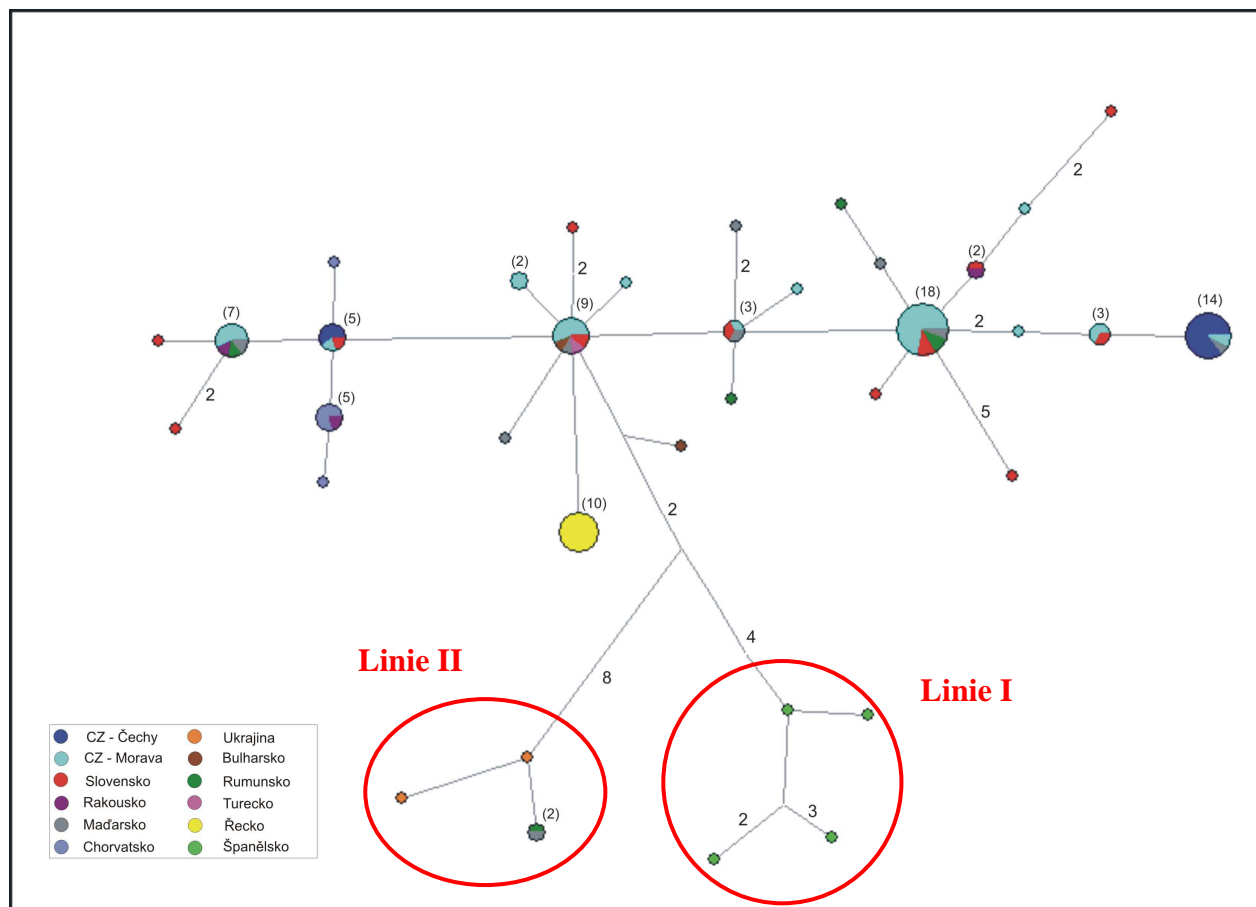
Tabulka 17: Základní informace o jednotlivých souborech analyzovaných dat

4.2 Analýza dat

4.2.1 Haplotypová síť

4.2.1.1 Haplotypová síť pro gen COI

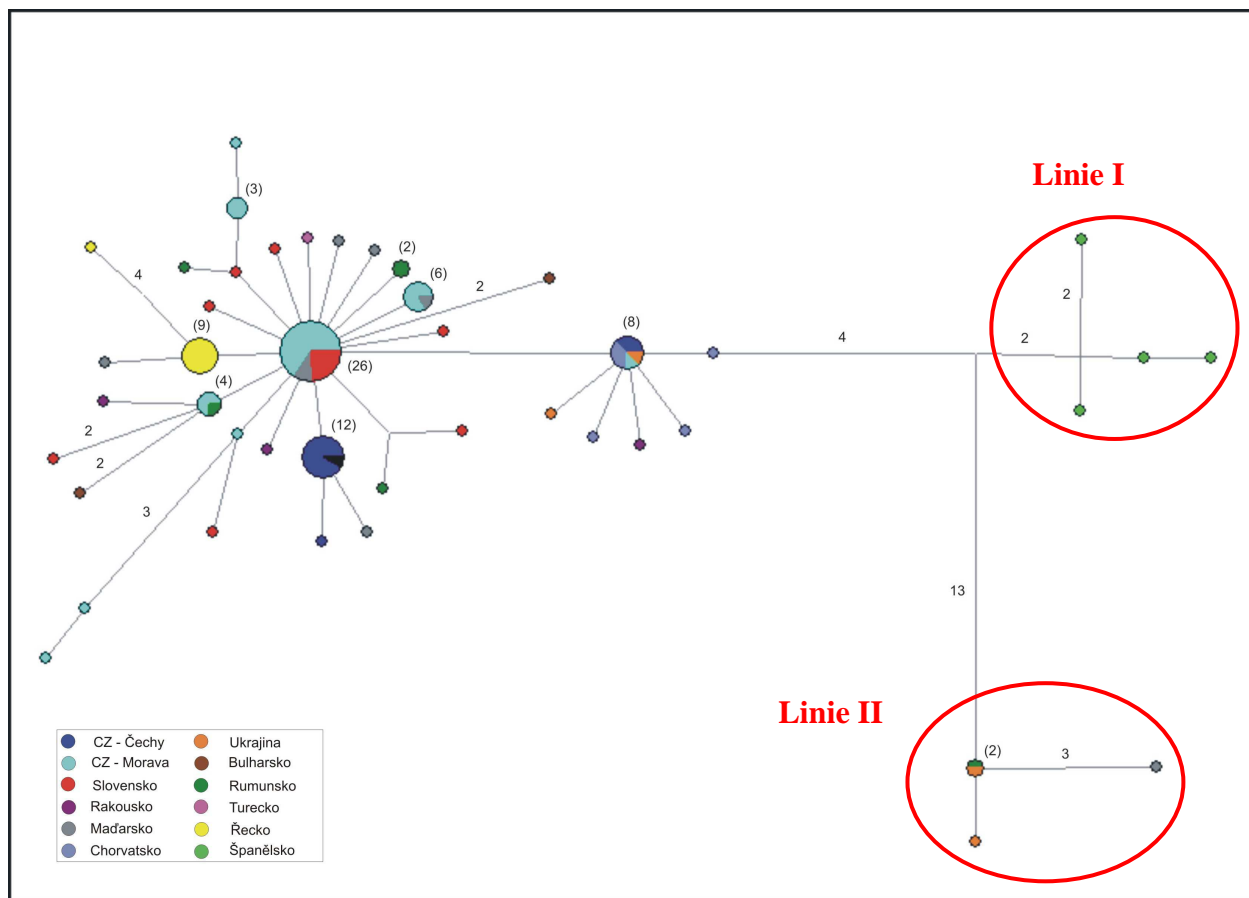
Na základě genu COI bylo identifikováno 41 haplotypů dle FaBoxu (<http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/>, Villesen 2007). Genealogické vztahy mezi haplotypy znázorňuje haplotypová síť (obr. 5), která byla získána metodou Median-Joining tree. Síť ukazuje na tři jasné oddělené linie. První jsou haplotypy pocházející ze Španělska (linie I), druhou linii představují vzorky, které pocházejí z Ukrajiny, Maďarska a Rumunska (linie II). Poslední skupinou jsou haplotypy ostatních vzorků. Linie I, respektive linie II jsou od ostatních haplotypů odděleny celkem 6, respektive 10 mutacemi.



Obrázek 5: Median-Joining tree zobrazující genealogické vztahy mezi haplotypy genu COI zkoumaného druhu *Mantis religiosa*. Jednotlivé haplotypy jsou znázorněné barevnými kruhy, jejichž velikost odpovídá počtu jedinců se shodným haplotypem. Čísla v závorkách udávají počet jedinců v rámci jednotlivých kruhů (vyznačeno pro $n > 1$). Čísla na spojnících označují počet mutací mezi haplotypy (vyznačeno pro $n > 1$). Linie I a II označují výrazněji odlišené haplotypy.

4.2.1.2 Haplotypová síť pro gen COII

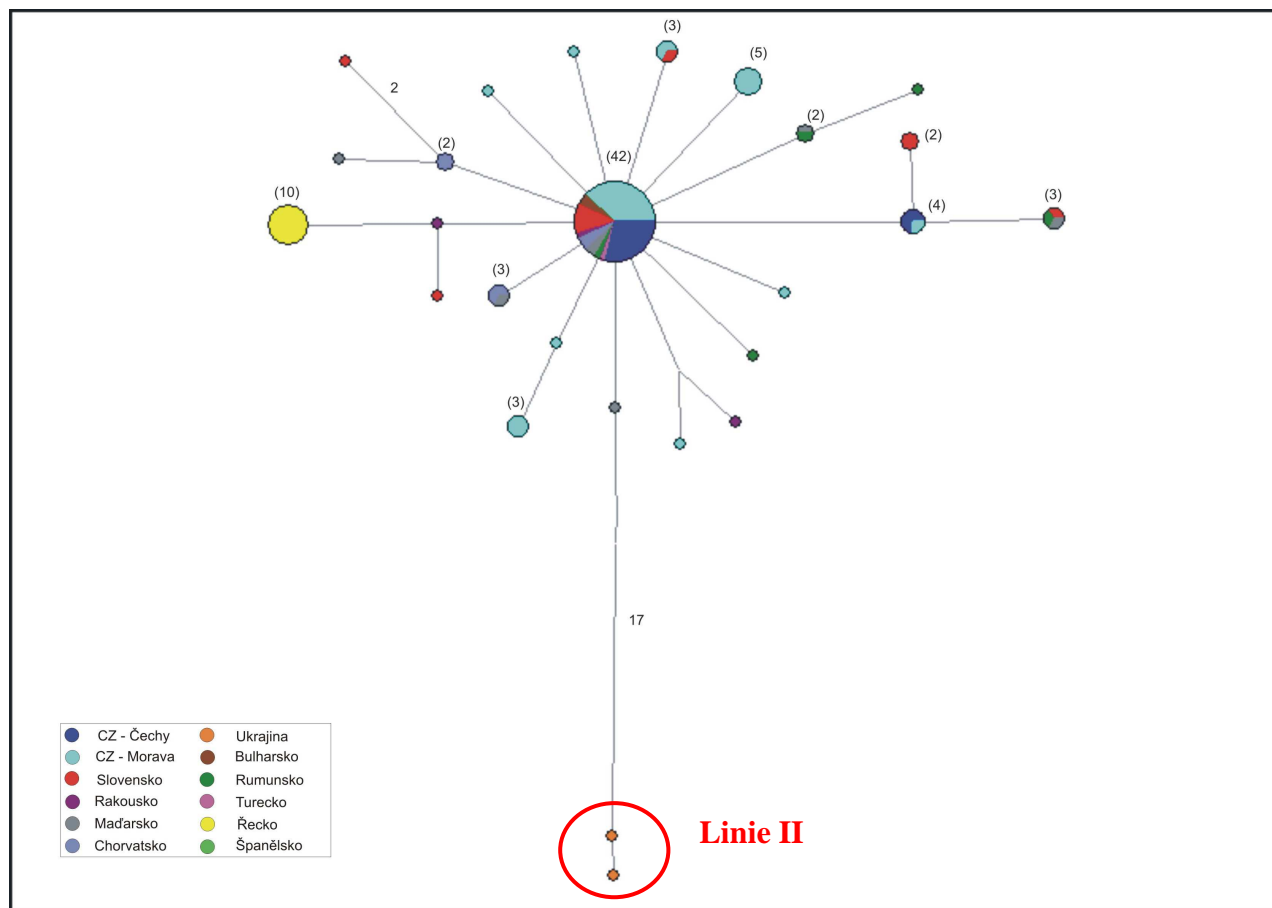
Pro gen COII bylo pomocí haplotypové sítě zjištěno 62 haplotypů (dle FaBoxu (<http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/>, Villesen 2007)). I tato byla získána metodou Median-joining tree (obr. 6). Výsledky této sítě jsou dost podobné té předchozí pro gen COI. Opět se zde oddělily tři patrné linie. Vzorky původem ze Španělska (linie I) spadají do jedné, do druhé pak některé vzorky z Ukrajiny, Rumunska a Maďarska (linie II). Do poslední linie pak spadají všechny zbývající. Oddělení těchto linií se shoduje s oddělením linií u haplotypové sítě pro COI. Linie I, respektive linie II jsou od zbytku odděleny 6 respektive 17 mutacemi.



Obrázek 6: Median-Joining tree zobrazující genealogické vztahy mezi haplotypy genu COII zkoumaného druhu *Mantis religiosa*. Haplotypy jsou znázorněné barevnými kruhy, jejichž velikost odpovídá počtu jedinců se shodným haplotypem. Čísla v závorkách udávají jejich počet (vyznačeno pro $n > 1$). Čísla na spojnicích označují počet mutací mezi haplotypy (vyznačeno pro $n > 1$).

4.2.1.3 Haplotypová síť pro gen cytb

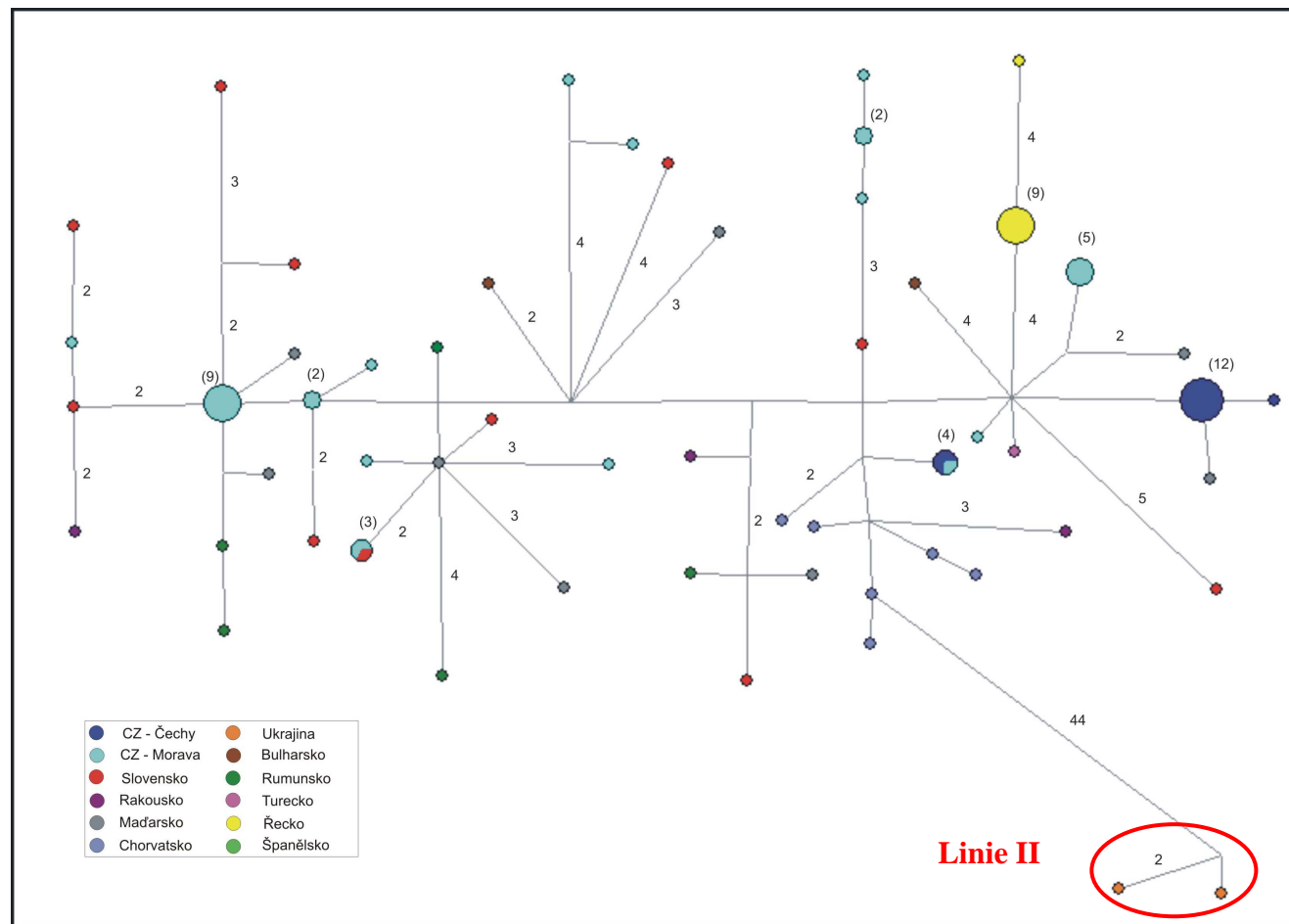
Na základě genu cytb bylo identifikováno 32 haplotypů dle FaBoxu (<http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/>, Villesen 2007). Haplotypová síť vytvořená metodou Median-Joining tree znázorňuje vzájemné genealogické vztahy haplotypů (obr. 7). V této síti, kde chybí některé vzorky, které tvořily u předchozích dvou dvě samostatné linie, se objevují pouze dvě linie. Větev, která zahrnuje dva vzorky z Ukrajiny (linie II) a druhá pak zahrnuje haplotypy zbylých vzorků. Je zde také poměrně velké zastoupení jednoho z haplotypů. Linie II je od ostatních oddělena 17 mutacemi.



Obrázek 7: Median-Joining tree zobrazující genealogické vztahy mezi haplotypy genu *cytb* zkoumaného druhu *Mantis religiosa*. Haplotypy jsou znázorněné barevnými kruhy, jejichž velikost odpovídá počtu jedinců se shodným haplotypem. Čísla v závorkách udávají jejich počet (vyznačeno pro $n > 1$). Čísla na spojnicích označují počet mutací mezi haplotypy (vyznačeno pro $n > 1$).

4.2.1.4 Haplotypová síť pro geny COI, COII a cytb

Poslední haplotypovou sítí, která byla opět vytvořena metodou Median-Joining tree je síť, která zastupuje všechny tři geny, COI, COII a cytb (obr. 8). Z této sítě je patrné, že nevybočuje žádná linie haplotypů nějak markantněji. Výrazněji vzdálené jsou pouze dva vzorky zastupující lokality v Ukrajině. Tento vzor byl viditelný už u haplotypové sítě pro gen cytb. Opět zde totiž chybí vzorky, které u sítí pro COI a COII dva tvořily další dvě linie.



Obrázek 8: Median-Joining tree zobrazující genealogické vztahy mezi haplotypy genů COI, COII a cytb zkoumaného druhu *Mantis religiosa*. Haplotypy jsou znázorněné barevnými kruhy, jejichž velikost odpovídá počtu jedinců se shodným haplotypem. Čísla v závorkách udávají jejich počet (vyznačeno pro $n > 1$). Čísla na spojnicích označují počet mutací mezi haplotypy (vyznačeno pro $n > 1$).

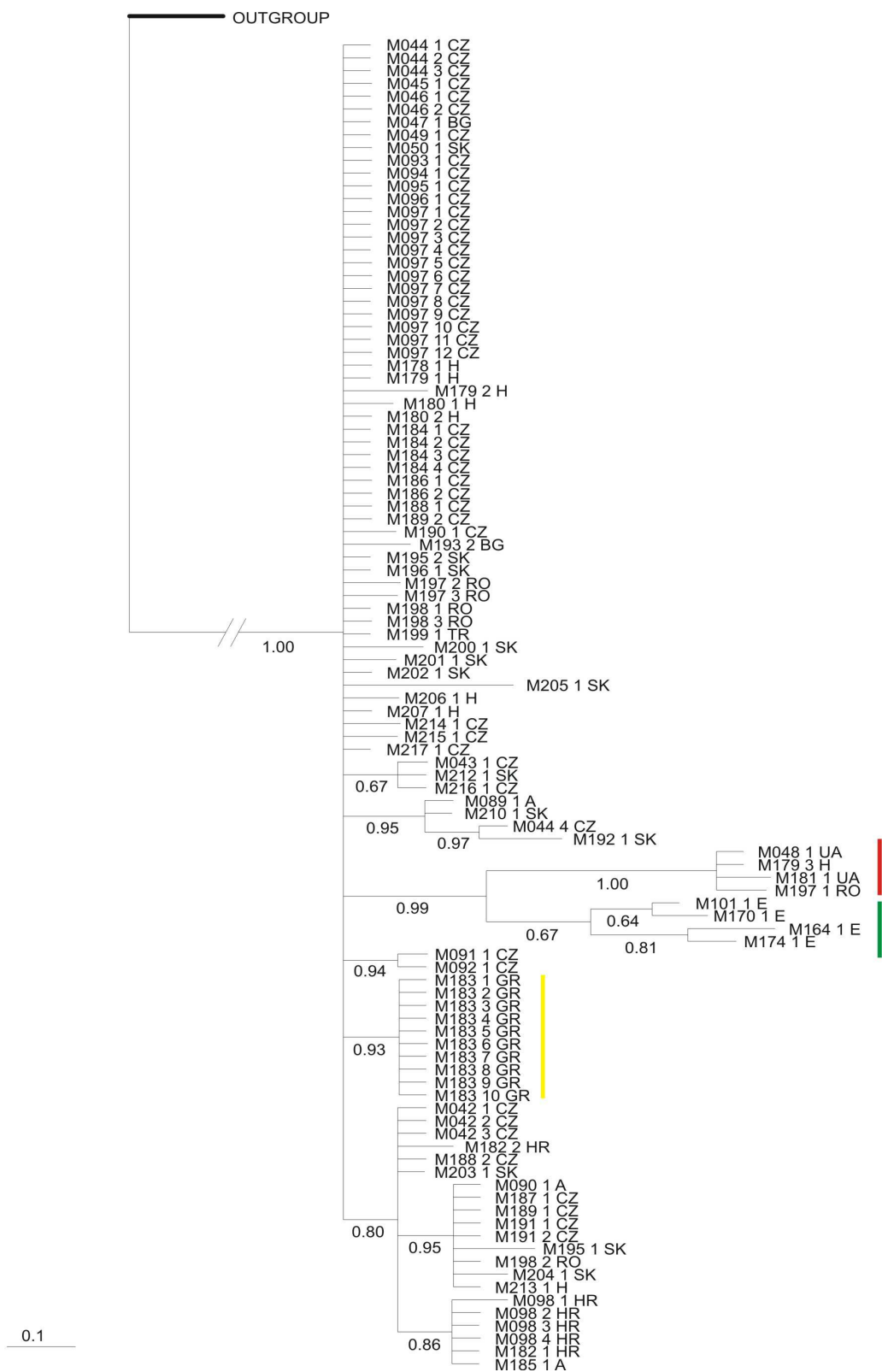
4.2.2 Fylogenetické analýzy

Jednotlivé datasety byly analyzovány metodou Bayesovské analýzy (BA) a maximum likelihood (ML). Na sekvence genů COI, COII a cyt b byl při výpočtu stromu BA nastaven model GTR+I+G a u ML by použit pro všechny geny model GTRGAMMA.

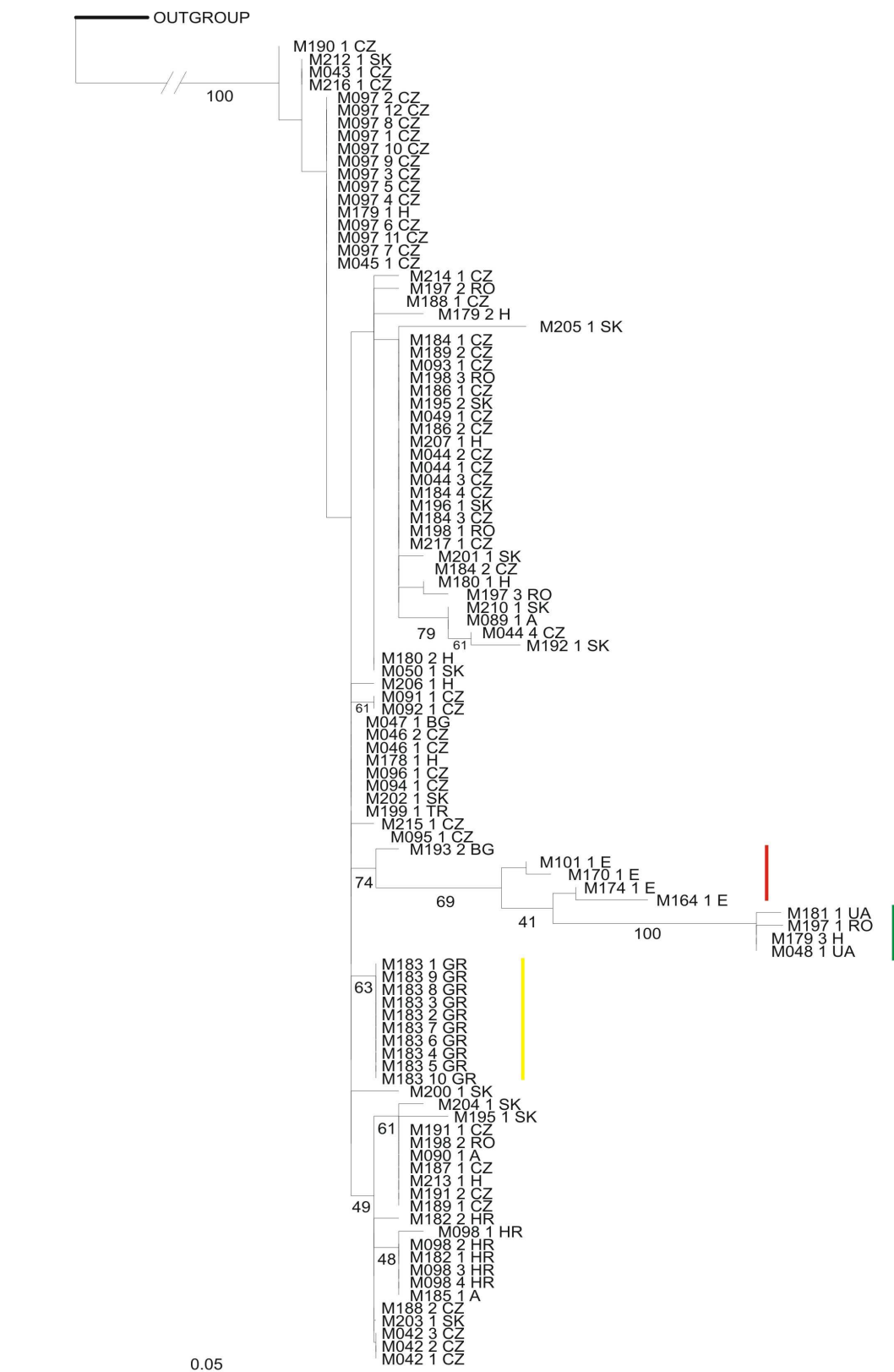
4.2.2.1 Dataset genu COI

Fylogenetické stromy vytvořené na základě datasetu části genu cytochromoxidázy I metodami BA a ML vykazují přibližně stejnou topologii. Jsou zde rozeznatelné tři linie (obr. 9 a 10). U BA má velkou podporu větev, která zahrnuje všechny vzorky ze Španělska (zeleně), některé z Ukrajiny (celkem dva), jeden z Maďarska a jeden z Rumunska (červeně). Zbytek vztahů v rámci stromu je poněkud nejasný.

Dobře oddělená je skupina vzorků z Řecka (žlutě).



Obrázek 9: Konzenzuální fylogenetický strom („Majority rule“) vypočteny na základě genu COI Bayesovskou analýzou (model GTR+I+G). V uzlech jsou uvedeny hodnoty posteriorní pravděpodobnosti. Počet generací 14 mil.

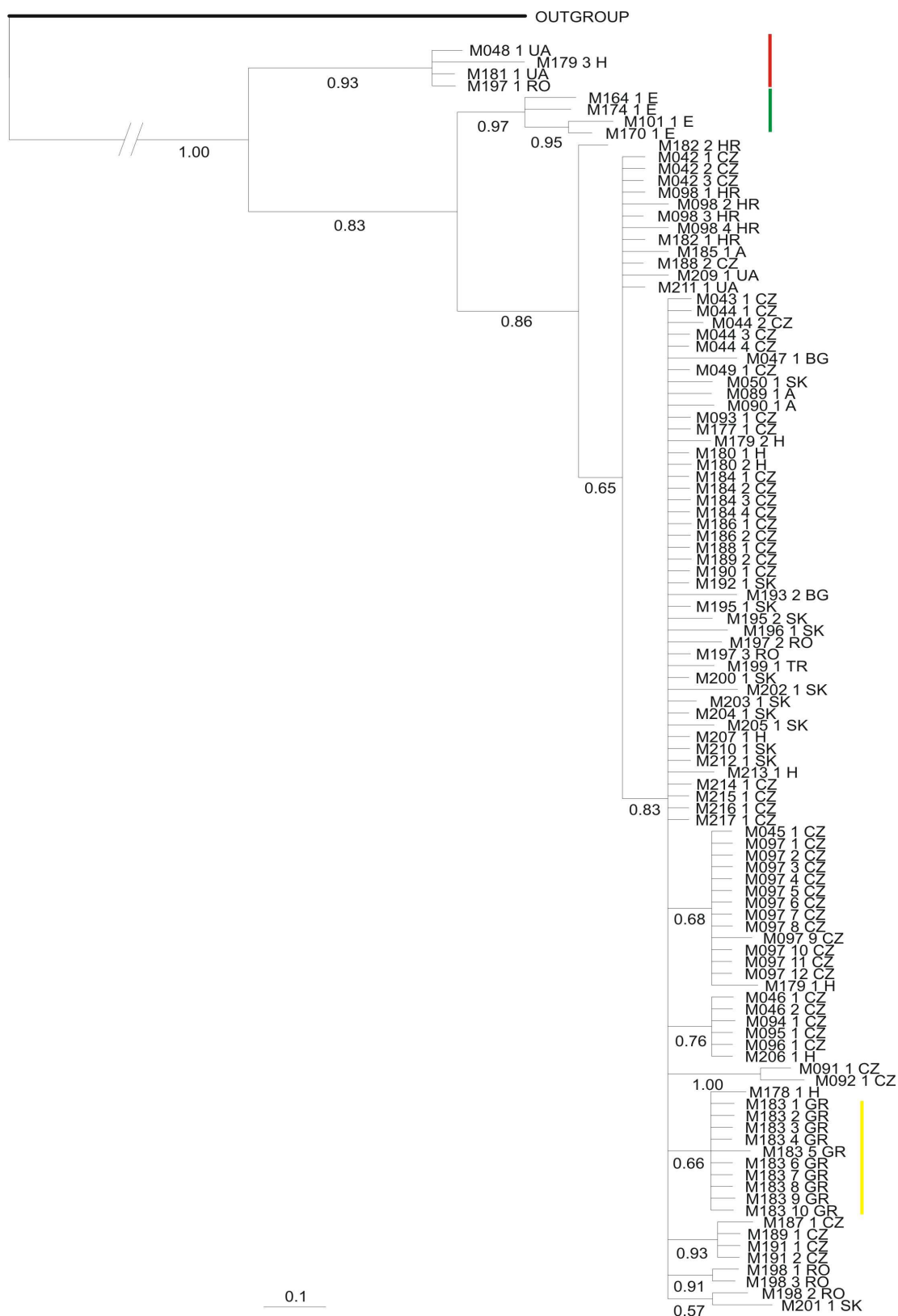


Obrázek 10: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu COI metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech jsou uvedeny hodnoty bootstrapu větší než 40%.

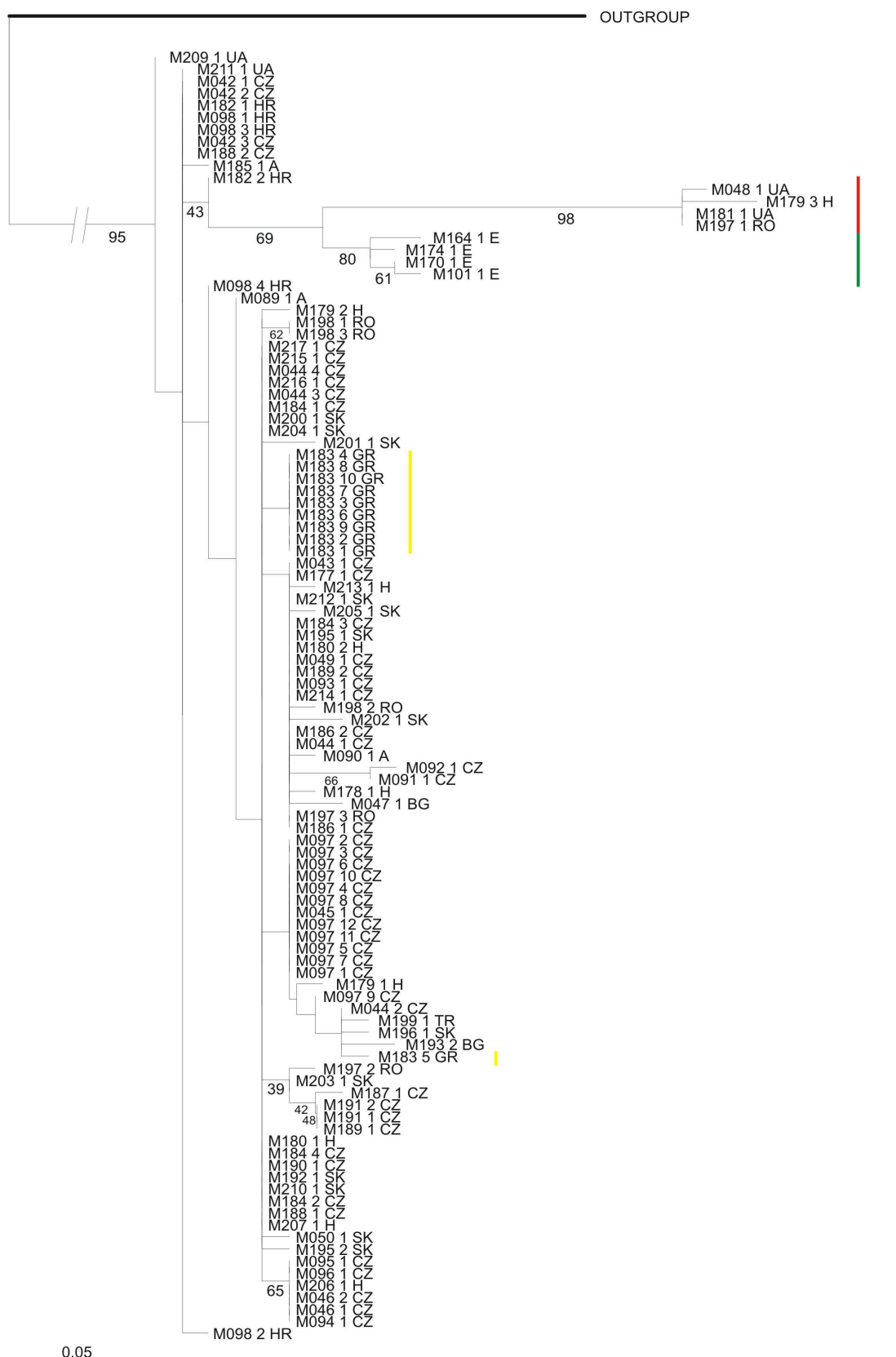
4.2.2.2 Dataset genu COII

Na základě datasetu části genu cytochromoxidázy II byly vytvořeny fylogenetické stromy metodami BA a ML (obr. 11 a 12). Topologie stromu je podobná jako u předchozích pro gen COI. Opět jsou zde tři linie stejné jako u topologie genu COI. Nejvíce bazálně spadá u BA linie obsahující vzory z Ukrajiny, Maďarska a Rumunska (červená). Druhou linii představují jedinci ze Španělska (zelená). Za třetí linií by pak bylo možné považovat zbývající vzorky. U ML vycházejí tyto linie podobně, ale už nikoliv na bázi.

Do stejné skupiny u všech topologií spadají všechny vzorky z Řecka (žlutě).



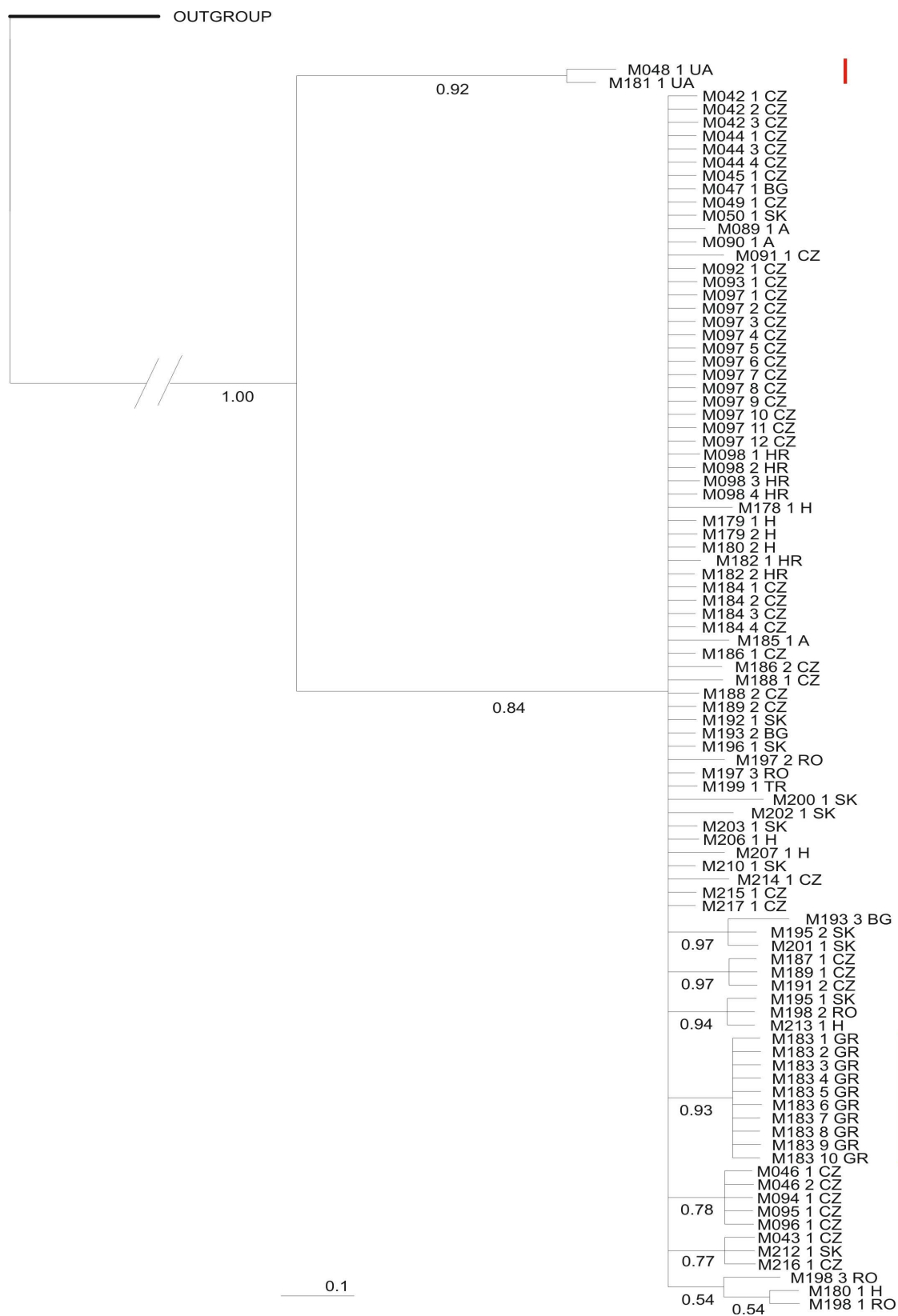
Obrázek 11: Konzenzuální fylogenetický strom („Majority rule“) vypočteny na základě genu COII Bayesovskou analýzou (model GTR+I+G). V uzlech jsou uvedeny hodnoty posteriorní pravděpodobnosti. Počet generací 8 mil.



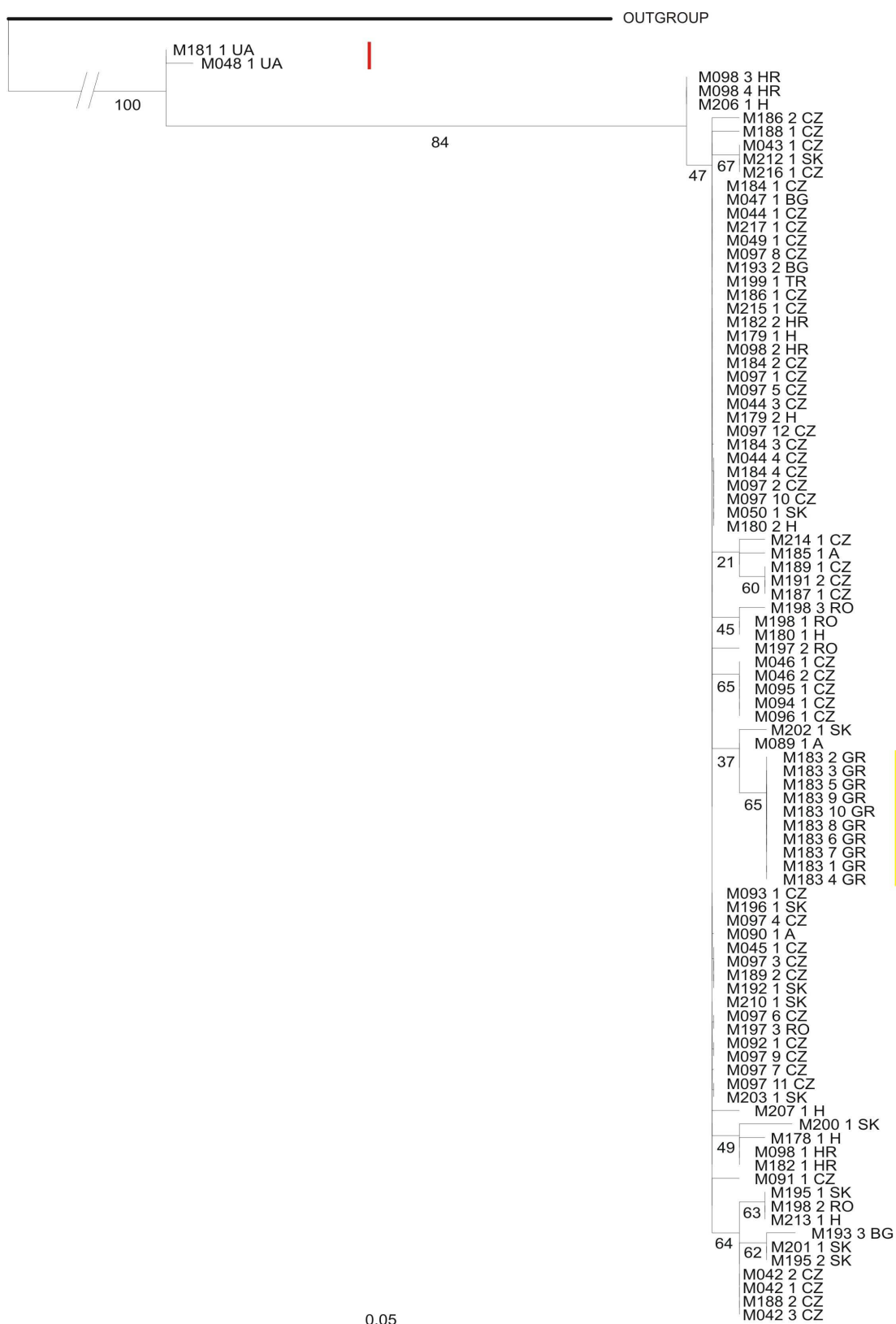
Obrázek 12: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu COII metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech jsou uvedeny hodnoty bootstrapu větší než 40%.

4.2.2.3 Dataset genu cytb

U topologie vytvořené na základě datasetu části genu cytochromu b metodami BA a ML nejsou patrné linie, které se vyskytovaly u předchozích fylogenetických stromů (obr. 13 a 14). V tomto datasetu chybělo několik vzorků, které byly součástí některých linií. Takto se zde objevují pouze dvě linie. Na bázi se vyskytují vzorky původem z Ukrajiny (celkem dva), které jsou shodné s bázemi topologií pro COI a COII. Druhá linie opět zahrnuje zbytek vzorků. Vzorky z Řecka spadají opět do stejné skupiny.



Obrázek 13: Konzenzuální fylogenetický strom („Majority rule“) vypočteny na základě genu cytb Bayesovskou analýzou (model GTR+I+G). V uzlech jsou uvedeny hodnoty posteriorní pravděpodobnosti. Počet generací 5 mil.

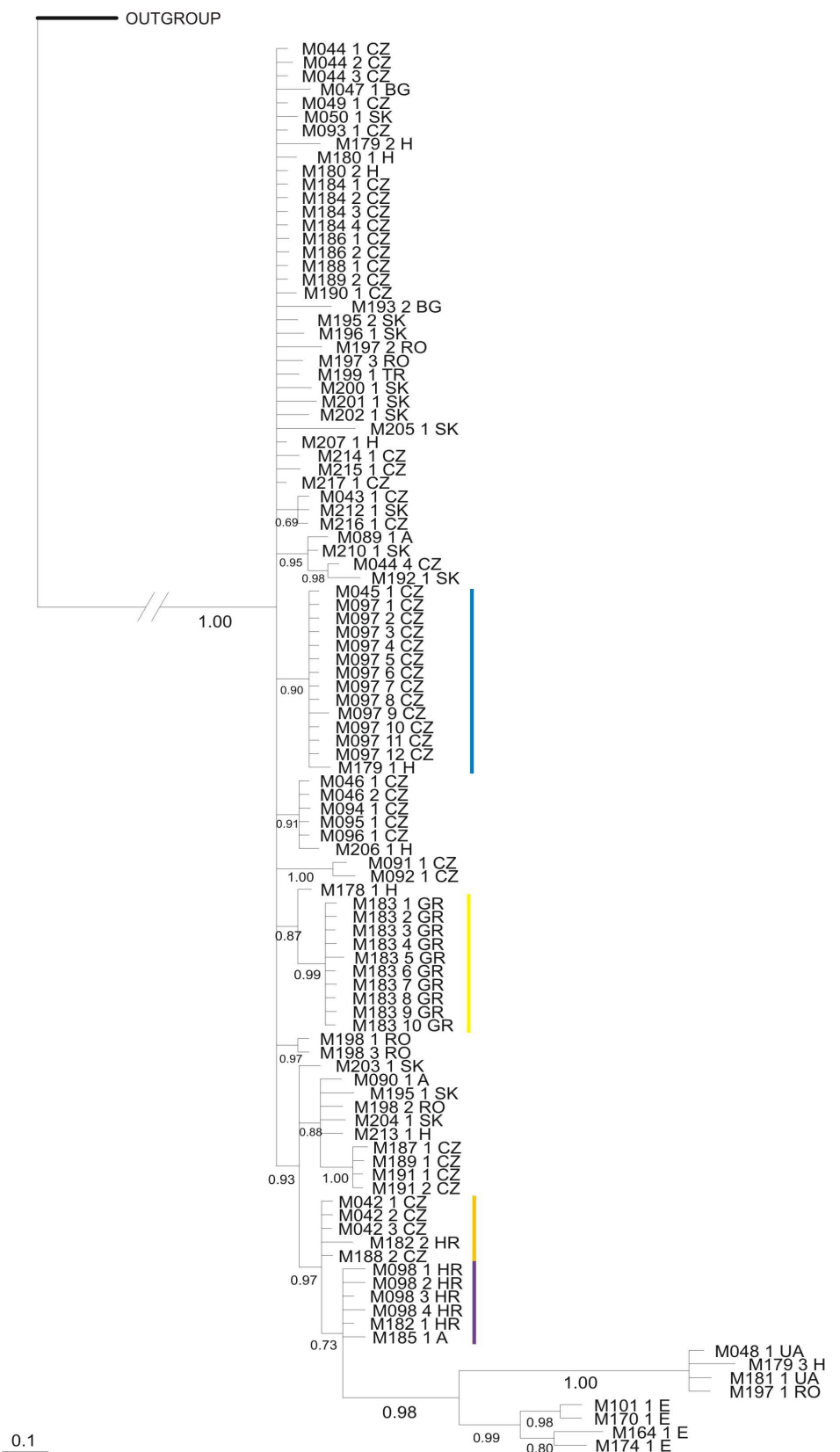


Obrázek 14: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu cytb metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech jsou uvedeny hodnoty bootstrapu větší než 40%.

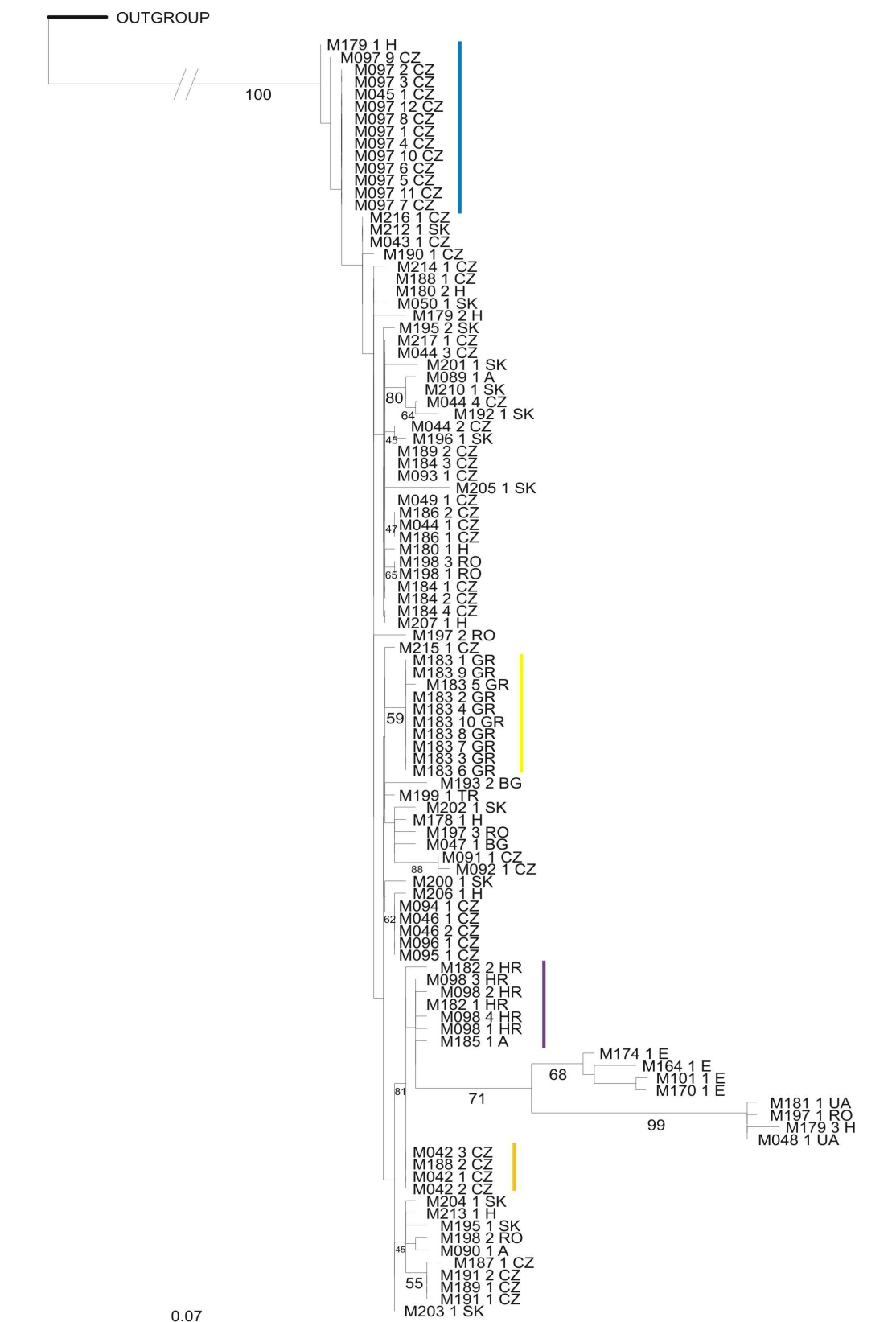
4.2.2.4 Dataset konkaténátu genu COI + COII

Dataset konkaténátu genu cytochromoxidázy I a II byl použit k vytvoření fylogenetických stromů metodami BA a ML (obr. 15 a 16) a opět vykazuje tři oddělené linie, které se shodují s předchozími. S velkou podporou větví vychází opět skupina španělských vzorků (zeleně), která tvoří jednu linii, a také skupina dvou z Ukrajiny, z Maďarska a Rumunska (červeně). Ostatní větve nemají příliš velkou podporu. Dobrou podporu má větev obsahující vzorky z Řecka (žlutě). Vysokou podporu má i větev obsahující vzorky z České republiky (konkrétně z Žehuňské obory, modrá) a kam spadá také jeden vzorek z Maďarska.

Na bázi linie I a II vychází dvě skupiny vzorků s celkem velkou podporou. Jedna skupina zahrnuje vzorky pocházející z Chorvatska, kam se přidružuje i jeden vzorek z Rakouska (fialová). Druhá skupina, více bazálně, zahrnuje vzorky z České republiky, konkrétně z oblasti Přerova nad Labem, a jeden vzorek z oblasti Velkého Meziříčí (oranžová). V této skupině je i jeden vzorek s Chorvatska.



Obrázek 15: Konzenzuální fylogenetický strom („Majority rule“) vypočteny na základě konkatenátu genu COI a COII Bayesovskou analýzou (model GTR+I+G). V uzlech jsou uvedeny hodnoty posteriorní pravděpodobnosti. Počet generací 4 mil.

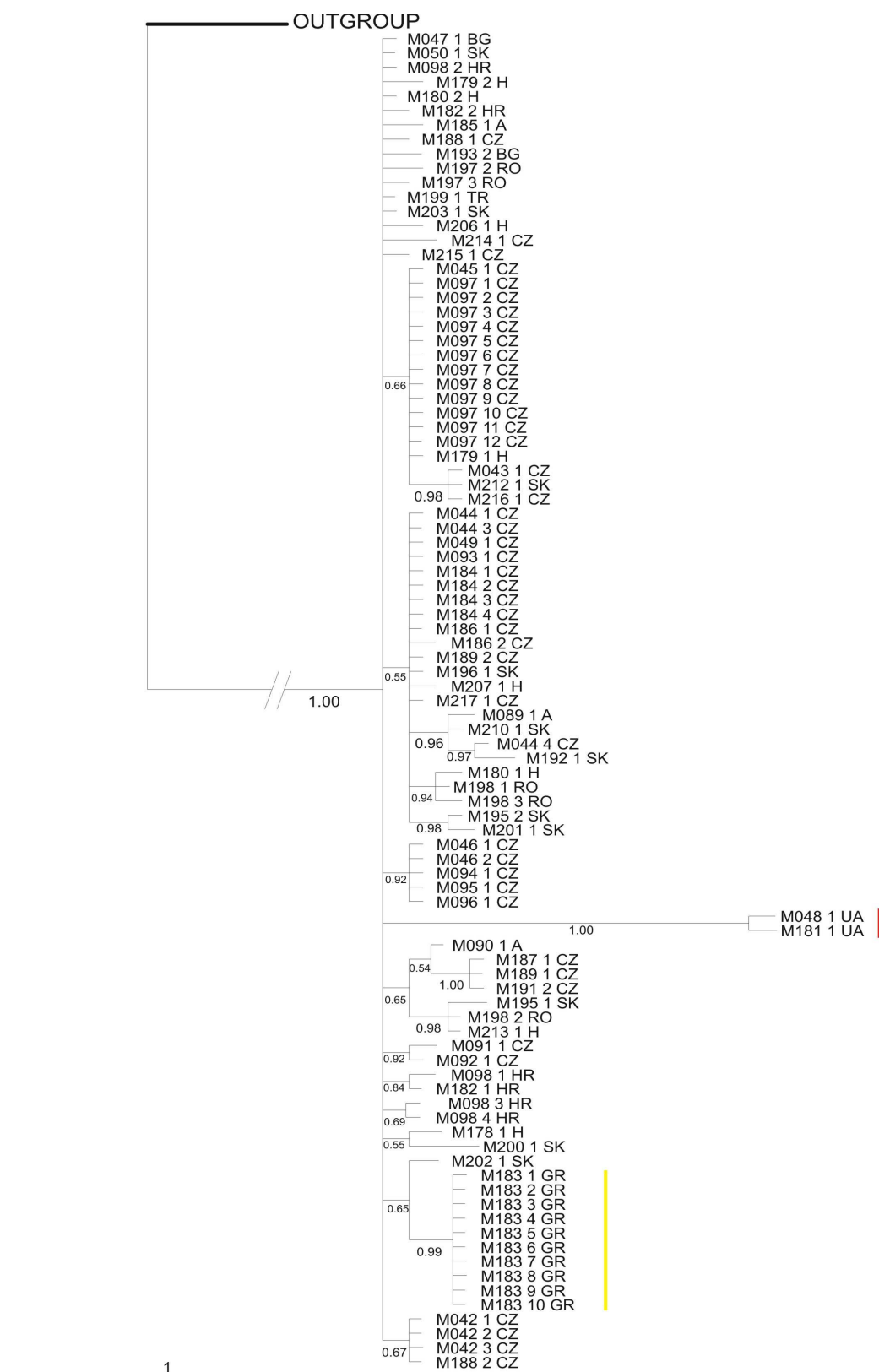


Obrázek 16: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkaténátu genu COI a COII metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech jsou uvedeny hodnoty bootstrapu větší než 40%.

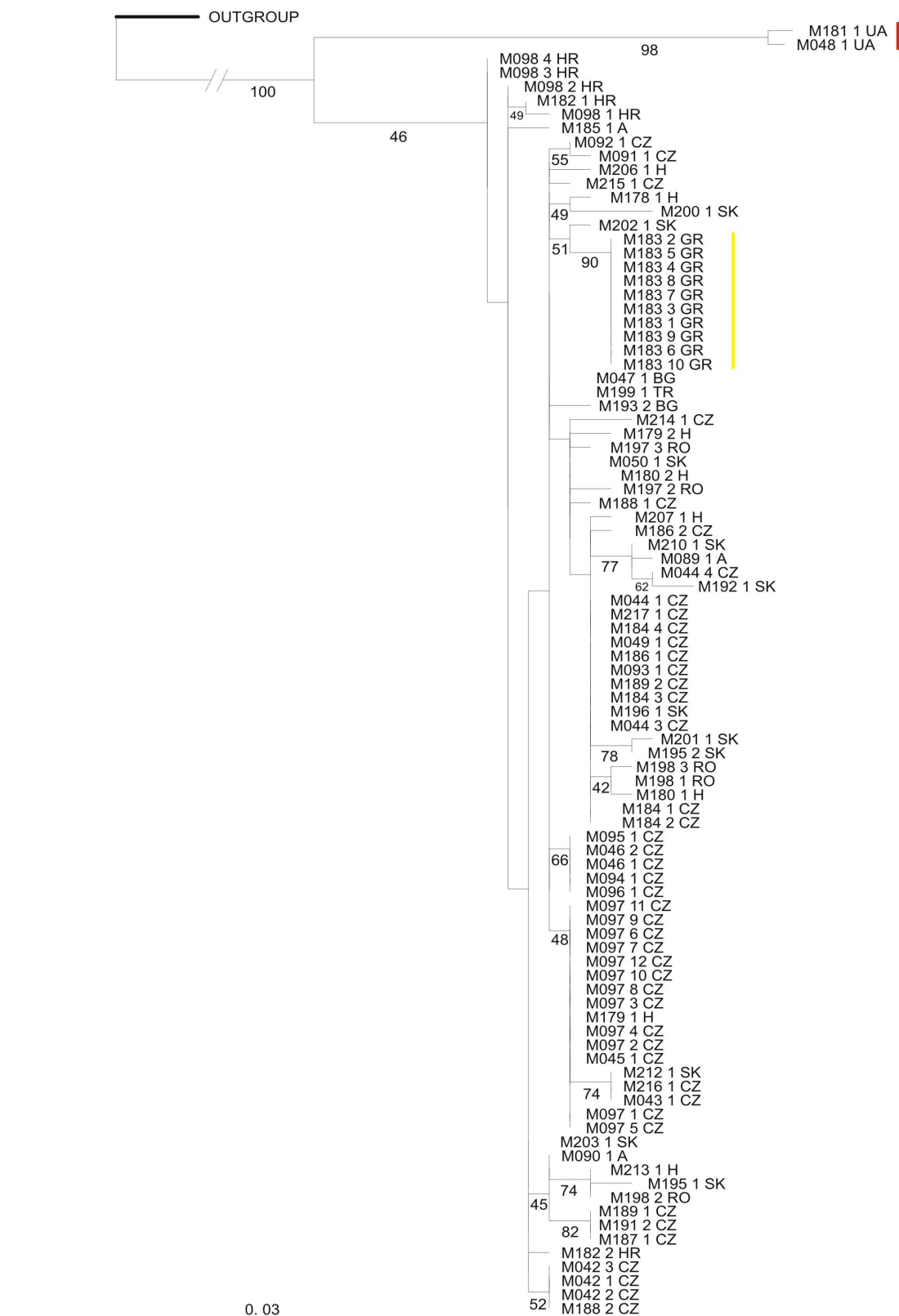
4.2.2.5 Dataset konkaténátu genu COI + cyt b

Topologie fylogenetických stromů datasetu konkaténátu pro dva geny COI a cyt b byla vytvořena metodou BA a ML (obr. 17 a 18). Velmi vysokou podporu větví mají dva vzorky z Ukrajiny (červená), které u topologie ML spadají na bázi fylogenetického stromu. Dobrou podporu má i větev obsahující vzorky z Řecka (žlutě), která je vysoká u obou fylogenetických stromů.

V tomto datasetu opět chyběly vzorky ze Španělska a některé další.



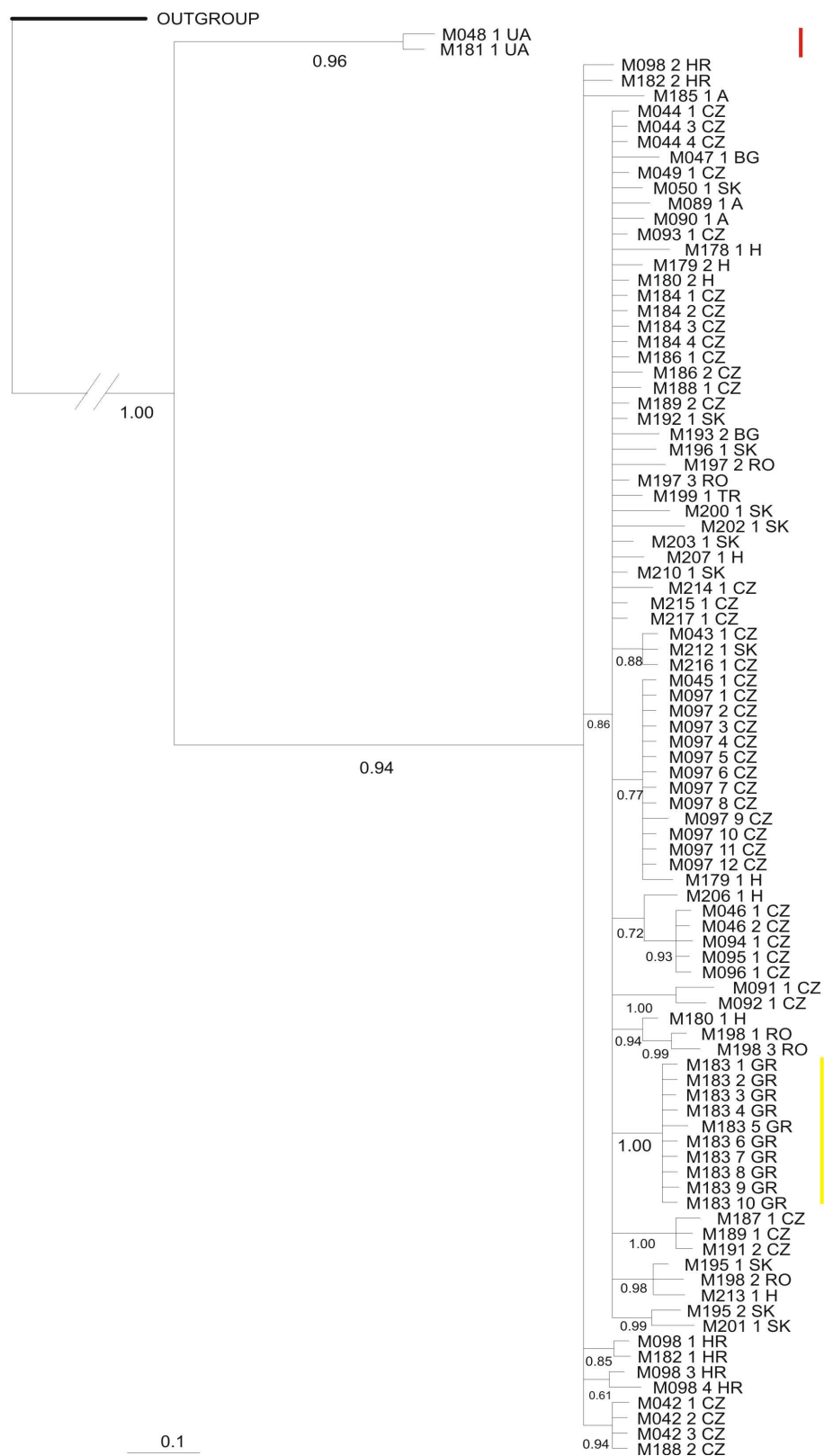
Obrázek 17: Konzenzuální fylogenetický strom („Majority rule“) vypočteny na základě konkaténátu genu COI a cytb Bayesovskou analýzou (model GTR+I+G). V uzlech jsou uvedeny hodnoty posteriorní pravděpodobnosti. Počet generací 4,5 mil.



Obrázek 18: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkatenátu genu COI a cytb metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech jsou uvedeny hodnoty bootstrapu větší než 40%.

4.2.2.6 Dataset konkaténátu genu COII + cyt b

Dataset konkaténátu pro gen COII a cyt b pomocí metody BA a ML dal vzniknout fylogenetickým stromům o podobné topologii (obr. 19 a 20). Na bázi stromu vychází dva vzorky z Ukrajiny (červeně), jejichž pozice je silně podpořena. Tvoří tak jednu linii. Do druhé spadají zbylé vzorky. Velkou podporu v rámci této skupiny mají vzorky z Řecka (žlutě), a v obou topologiích, jak u BA, tak i u ML .



Obrázek 19: Konzenzuální fylogenetický strom („Majority rule“) vypočteny na základě konkatenátu genu COII a cyt b Bayesovskou analýzou (model GTR+I+G). V uzlech jsou uvedeny hodnoty posteriorní pravděpodobnosti. Počet generací 3,5 mil.

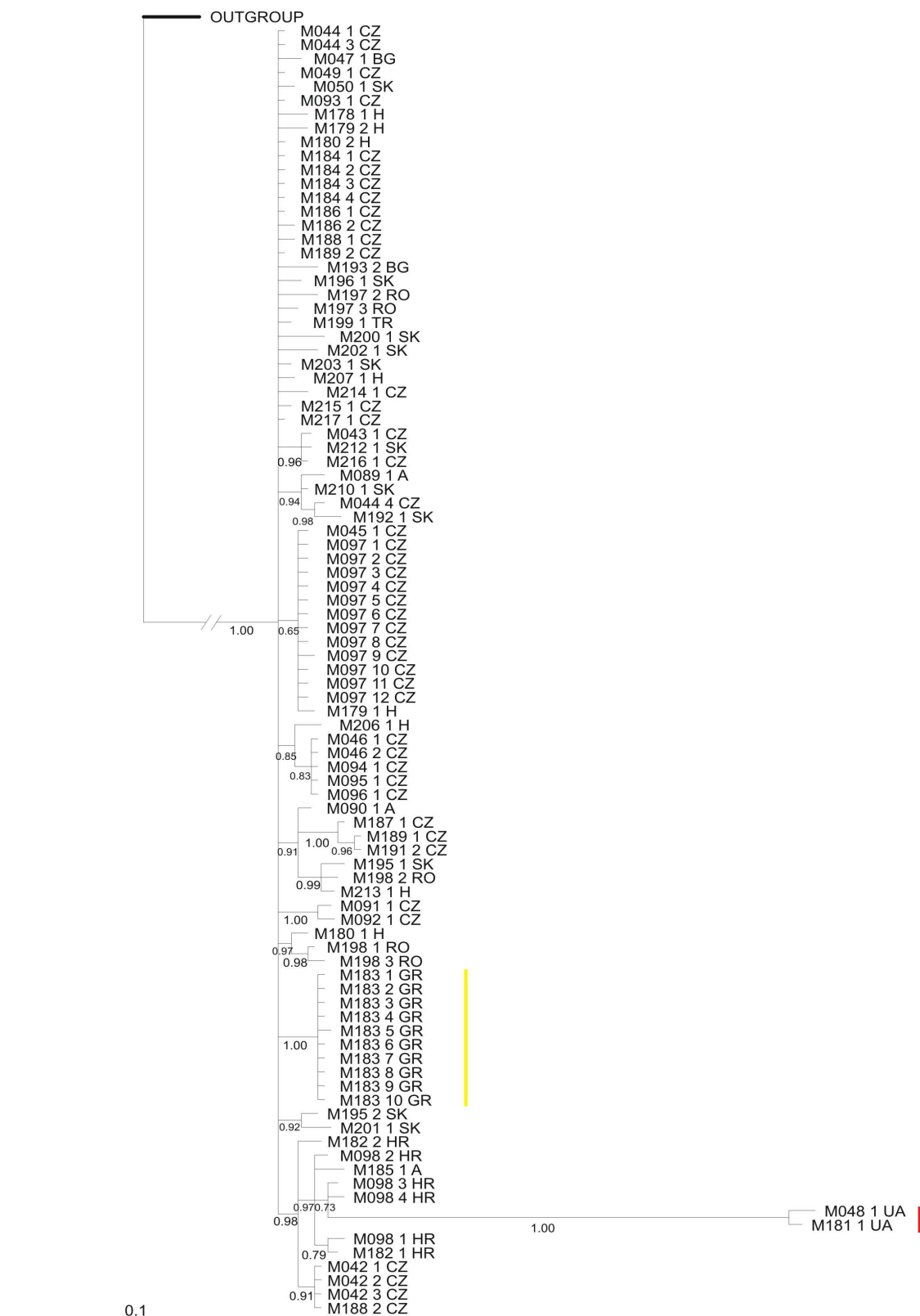


Obrázek 20: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkaténátu genu COII a cytb metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech jsou uvedeny hodnoty bootstrapu větší než 40%.

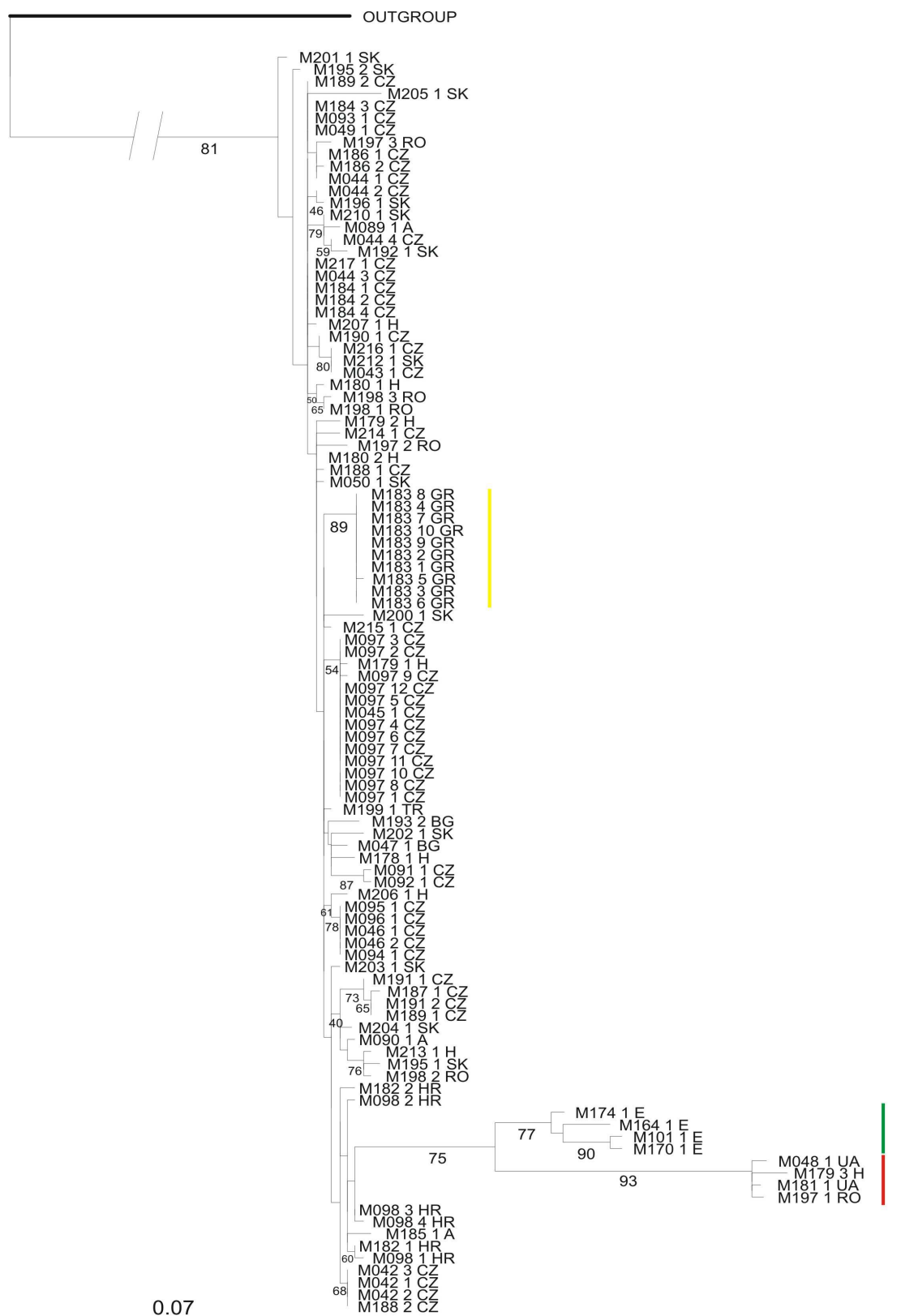
4.2.2.7 Dataset konkaténátu genu COI + COII + cytb

Pro dataset konkaténátu všech tří genů COI, COII a cytb vznikly pomocí metod BA a ML dva fylogenetické stromy (obr. 21 a 22) s poněkud odlišnou topologií způsobenou nepřítomností několika vzorků u datasetu pro cytb. Absence těchto vzorků se projevuje na topologii stromu vytvořeném metodou BA. Silnou podporu zde mají dva vzorky z Ukrajiny (červeně). Stejně silnou podporu má i větev, která zahrnuje všechny vzorky z Řecka (žlutě).

Topologie fylogenetického stromu vytvořeného metodou ML zahrnuje dvě silně podpořené větve. Jedna obsahuje vzorky ze Španělska (zeleně), druhá silně podpořená větev pak vzorky z Ukrajiny, které jsou i v topologii vytvořenou metodou BA, a dále po jednom vzorku z Rumunska a z Maďarska. Další dobře podpořená je větev zahrnující řecké vzorky (žlutě), které spadají k sobě všechny, a žádný se nevyskytuje v jiné pozici na stromu.



Obrázek 21: Konzenzuální fylogenetický strom („Majority rule“) vypočteny na základě konkatenátu genu COI, COII a cyt b Bayesovskou analýzou (model GTR+I+G). V uzlech jsou uvedeny hodnoty posteriorní pravděpodobnosti. Počet generací 19,5 mil.



Obrázek 22: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkaténátu genu COI, COII a cytb metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech jsou uvedeny hodnoty bootstrapu větší než 40%.

4.2.3 Mikrosatelity

Celkem bylo získáno 9 funkčních mikrosatelitových lokusů pro druh *Mantis religiosa*, které byly postupně analyzovány ve dvou multiplexech. Při testování lokusů bylo použito celkem 103 jedinců z 53 populací z 11 států v rámci Evropy. Nicméně ne všechny jedince se pro každý lokus podařilo amplifikovat (viz tabulka 18). V případě neamplifikovaných vzorků se pravděpodobně jednalo o nekvalitní DNA či špatně nasedající lokusy.

V programu Cervus 3.0 (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007) byl u všech analyzovaných vzorků zjištěn počet alel na jednotlivých lokusech, pozorovaná a očekávaná heterozygotnost, Hardyho-Weinbergova rovnováha a frekvence nulových alel. Genotypy všech analyzovaných jedinců jsou uvedeny v tabulce 18.

Lokus	k	N	HObs	HExp	HW	F(Null)
gagaq3	11	95	0.053	0.675	***	+0.8550
gcef3	12	103	0.777	0.872	*	+0.0570
GB1W6	29	100	0.400	0.954	ND	+0.4069
c96_	21	84	0.440	0.910	***	+0.3487
C550_	20	85	0.412	0.925	ND	+0.3833
c181_	12	83	0.301	0.806	***	+0.4552
GBHVR	4	73	0.712	0.554	NS	-0.1378
gbij3	26	67	0.358	0.923	***	+0.4416
GBN3Q	3	41	0.098	0.337	ND	+0.5411

Tabulka 18: Charakteristika jednotlivých lokusů; k-počet alel, N-počet analyzovaných jedinců, HObs- pozorovaná heterozygotnost, HExp-očekávaná heterozygotnost, HW-Hardyho-Weinbergova rovnováha (NS-neprůkazné, * ** *** stupně průkaznosti-málo, středně a vysoce průkazné, ND-nedefinovatelné), F(null)-frekvence nulových alel.

Počet alel mezi analyzovanými vzorky na jednotlivých lokusech je v rozmezí 3 až 29 alel. Nejpolymorfnejším lokusem je GB1W6. Očekávaná heterozygotnost se pohybovala mezi 0,053-0,777 a pozorovaná heterozygotnost se pohybovala mezi 0,337-0,954.

Dále byl v programu Cervus 3.0 (Marshall et al., 1998; Kalinowski et al., 2007) zjišťován počet alel na jednotlivých lokusech, pozorovaná a očekávaná heterozygotnost, Hardyho-Weinbergova rovnováha a frekvence nulových alel pro vzorky pocházející z ČR a poté také z populace z Žehuňské obory, kde byl počet sebraných jedinců vyšší

než 10 kusů kudlanek. Genotypy všech analyzovaných jedinců jsou uvedeny v tabulce 19 a 20.

ČR

Lokus	k	N	HObs	HExp	HW	F(Null)
gagaq3	7	45	0.044	0.569	***	+0.8536
gcef3	10	48	0.750	0.865	NS	+0.0696
GB1W6	18	46	0.435	0.919	***	+0.3544
c96_	18	41	0.585	0.891	***	+0.2100
C550_	17	44	0.455	0.910	***	+0.3337
c181_	8	40	0.275	0.811	***	+0.4856
GBHVR	4	33	0.576	0.532	NS	-0.0398
gbij3	19	33	0.364	0.918	***	+0.4294
GBN3Q	3	25	0.120	0.375	*	+0.5015

Tabulka 19: Charakteristika jednotlivých lokusů vzorků z České republiky; k-počet alel, N-počet analyzovaných jedinců, HObs-pozorovaná heterozygotnost, HExp-očekávaná heterozygotnost, HW-Hardyho-Weinbergova rovnováha (NS-neprůkazné, * ** *** stupně průkaznosti-málo, středně a vysoce průkazné, ND-nedefinovatelné), F(null)-frekvence nulových alel.

Žehuňská obora

Lokus	k	N	HObs	HExp	HW	F(Null)
gagaq3	2	13	0.000	0.516	**	+0.9995
gcef3	7	13	0.750	0.823	NS	+0.0306
GB1W6	7	13	0.375	0.694	NS	+0.2743
c96_	4	9	0.222	0.529	ND	ND
C550_	7	14	0.429	0.802	NS	+0.2984
c181_	4	12	0.250	0.714	NS	+0.4763
GBHVR	2	10	0.400	0.337	ND	-0.1097
gbij3	6	12	0.417	0.830	NS	+0.3007
GBN3Q	2	9	0.333	0.425	ND	ND

Tabulka 20: Charakteristika jednotlivých lokusů vzorků z Žehuňské obory; k-počet alel, N-počet analyzovaných jedinců, HObs-pozorovaná heterozygotnost, HExp-očekávaná heterozygotnost, HW-Hardyho-Weinbergova rovnováha (NS-neprůkazné, * ** *** stupně průkaznosti-málo, středně a vysoce průkazné, ND-nedefinovatelné), F(null)-frekvence nulových alel.

Počet alel mezi analyzovanými vzorky na jednotlivých lokusech je v rozmezí 3-19 pro ČR a v rozmezí 2-7 pro Žehuňskou oboru. Očekávaná heterozygotnost se

pohybovala mezi 0.375-0.919 pro ČR a pro Žehuňskou oboru byla v rozmezí 0.337-0.830. Pozorovaná heterozygotnost se pak pohybovala pro ČR a Žehuňskou oboru mezi 0.044-0.750, respektive 0.000-0.750.

Vzorky z ostatních lokalit sice byly programem Cervus zkusmo analyzovány, ale pro nedostatek dat zde nejsou výsledky uvedeny. Počet jedinců z jednotlivých lokalit nepřesahoval 10 kusů.

5. Diskuse

5.1 Data

Pro výzkum byly použity části tří mitochondriálních genů pro cytochromoxidázu I (COI), cytochromoxidázu II (COII) a cytochrom b (cytb). Z jednotlivých datasetů pak byly vytvořeny konkatenáty všech možných kombinací a ty dále zpracovávány.

Výběr mitochondriálních genů byl opřen o skutečnost, že se právě tyto geny staly velice využívaným markerem pro studium fylogeneze a fylogeografie hmyzu a většina studií vychází z výsledků získaných sekvencí mtDNA. Přestože mitochondriální DNA zahrnuje pouze malou část velikosti genomu organismů, je to nejpoužívanější marker pro takovéto studie. Jeho výhody jsou široce známy. Mitochondriální DNA se snadno amplifikuje díky tomu, že se vyskytuje v buňce v mnoha kopiích. U živočichů jsou mitochondriální geny bez přítomnosti intronů, obsahují jen velmi málo duplikací a mají jen krátké intergenové oblasti. Další výhodou je vysoká variabilita mtDNA a to díky vysoké mutační rychlosti. Může nám tedy poskytovat signál o populační historii v krátkém časovém úseku (Galtier et al. 2009).

Datasety pro jednotlivé geny byly v některých případech spojeny s dalšími datasety a vytvořeny konkatenáty více genů. Provedení ILD testu (Incongruence Length Difference test), který se používá k otestování konfliktu mezi částmi konkatenovaných datasetů (Farris et al. 1994), nebyl použit, jelikož jeho význam byl už několikrát zpochybněn (Yoder et al. 2001, Barker & Lutzoni 2002). Problémem může být saturace pozic v alignmentu, kdy by rozdíl v jedné pozici mohl maskovat větší počet záměn než je na první pohled v alignmentu patrné.

Pro studium fylogeografie jsou často používány geny pro COI a cytb (Dick et al. 2004, Emerson et al. 2000, Lunt et al. 1996). Další gen zahrnutý do analýz byl gen pro COII. COI i COII už byly použity pro studium fylogenetických vztahů v rámci řádu Mantodea (Svenson & Whiting 2004, 2009), kdy se zdál gen pro COII variabilní i na druhové úrovni. Po otestování (testování vhodnosti jednotlivých genu předcházelo řešení diplomové práce a není zahrnuto v této práci) variability genů se ukázalo, že část genu COII je dostatečně variabilní a hodí se pro analýzy stejně dobře jako COI. Nicméně to může být způsobeno i tím, že pro část genu COII byly k dispozici sekvence všech jedinců zahrnutých do této práce, zatímco u COI a cytb některé sekvence chyběly.

Dalším genem, který bylo možné při fylogeografii kudlanky nábožné použít, je gen ND4 (Svenson & Whiting 2009). Ten se ale při prvotních testech nezdál příliš variabilní. Nicméně v průběhu finalizace diplomové práce se podařilo navázat kontakt s Catherine Linn (Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Německo), která se zabývá fylogeografií kudlanek západní Evropy a tento gen úspěšně používá (pers. comm.).

5.2 Fylogenetické stromy

Datasets byly zpracovávány dvěma metodami analýzy fylogenetických stromů a to Bayesovskou metodou (BA) a metodou maximální věrohodnosti (maximum likelihood, MA). V základních rysech se topologie fylogenetických stromů příliš nelišila a v mnoha bodech byla shodná. Při tvorbě fylogenetických stromů se dále používá i metoda maximum parsimony (MP), která vychází z principu úspornosti a tvoří nejjednodušší stromy vzniklé co nejmenším počtem evolučních kroků (Swofford 2002). Tato metoda nebyla v této práci použita. Nicméně, haplotypové sítě jsou vytvářeny na základě metody maximální parsimonie a vzhledem k tomuto a skutečnosti, že topologie vycházející z bayesovské metody a metody maximum likelihood dopadly shodně, nebyla tato metoda provedena.

Dataset pro část genu COII byl kompletní a obsahoval sekvence všech shromážděných jedinců (celkem 107 jedinců *M. religiosa*, průměrná hodnota p-distance byla 0,5%). Nevznikal zde žádný problém s nečitelností sekvencí a tak byly zařazeny do následných analýz všechny. Pokud vezmeme v úvahu topologii fylogenetického stromu, který byl vytvořený Bayesovskou metodou, vykazuje topologie tři základní linie. Na bázi stromu se nachází linie (označovaná jako linie II), která zahrnuje celkem čtyři vzorky, dva z oblasti Ukrajiny, jeden z Rumunska a jeden z Maďarska. Druhá linie (označovaná jako linie I) zahrnuje také čtyři vzorky a všechny pocházejí ze Španělska. Nikde v rámci stromu se už žádní jedinci z této oblasti nevyskytují. Poslední, třetí linie, pak zahrnuje zbývající. Podobnou topologii vykazují i konkatenáty pro COII. V některých případech se nenachází linie I a II na bázi stromu, ale uvnitř kladogramu. To by mohlo být způsobeno efektem přitahování dlouhých větví („long-branch attraction“), způsobené výskytem stejných změn podél dlouhých a divergentních větví. Fylogenetické algoritmy tak neprávne umístí dlouhé větve do vzájemné blízkosti a současně chybně zařadí klád do celkové topologie stromu (Kim 1996).

Podobné vzory vykazují i fylogenetické stromy pro dataset COI, který není docela kompletní. Nebyly do něj, a to včetně konkatenátů, zahrnuty vzorky, jejichž sekvence byly nečitelné. Celkem bylo zahrnuto 104 vzorků z původních 107, protože u tří jedinců se nezdařilo získat sekvence. To mohlo být způsobeno nekvalitní DNA, případně špatnou amplifikací primerů. Topologie těchto stromů vykazuje podobné vzorky jako pro COII. V tomto případě se totiž nejednalo o tak velkou ztrátu informací z nezařazených vzorků, nejednalo se o vzorky, které tvořily bazální linie. Je možné, že v případě datasetu a konkatenátu zahrnující gen COI mohlo dojít k efektu přitahování dlouhých větví. Linie I a II nejsou zařazeny bazálně, ale opět uvnitř linie III. Nicméně se jedná o jasně oddělené linie.

Menší neshody vnášel do náhledu na fylogenezi *Mantis religiosa* dataset cyt b a jeho konkatenáty, který neobsahoval všechny vzorky, a chyběly právě ty, které tvořily samostatnou linii I nebo chyběla část vzorků, které spadaly do linie II (zařazeny byly pouze dva vzorky z Ukrajiny).

5.3 Haplotypové sítě

Pokud vezmeme v potaz i topologii haplotypových sítí, vykazuje podobné znaky, jaké byly patrné na fylogenetických stromech. Haplotypy vzorků ze Španělska a haplotypy zahrnující vzorky z linie II, jsou společně odděleny od ostatních haplotypů.

Výsledky těchto genetických dat mohou být zatíženy větší statistickou chybou, protože ze všech lokalit se nepodařilo zajistit dostatečné množství jedinců. Zpravidla se jednalo o jednoho až maximálně 13 jedinců, nejčastěji ale připadalo na lokalitu kolem jednoho až dvou jedinců. Další zkreslení dat je zřejmě způsobeno nedostatečným provzorkováním oblastí západní Evropy, odkud bylo shromážděno jen minimum jedinců, a to pouze ze Španělska. Jedinci ze států jako je například Francie, Itálie nebo Německo nebyli zajištěni. Absence dat z těchto oblastí tak neumožňuje hlubší náhled do fylogeneze druhu *Mantis religiosa* v rámci Evropy. Vzhledem k tomu, že se v oblasti apeninského poloostrova nacházelo jedno z předpokládaných hlavních refugií, odkud se rozšiřovaly druhy po době ledové zpět na sever Evropy (Bilton et al 1998, Taberlet 1998, Hewitt 1999, Hewitt 2001, Weiss & Ferrand 2007), je možné se domnívat, že právě chybějící vzorky z oblasti Itálie by mohly pomoci odhalit, zda se v době ledové do této oblasti uchýlila i *M. religiosa*. Získání vzorků z okolních států, jako je Francie či Německo, by mohlo pomoci určit směr jakým, a zda vůbec, se kudlanka z této oblasti

šířila. Dostačující není ani zastoupení vzorků z východní Evropy, které by mohly posloužit k detailnějšímu náhledu na směry šíření v rámci této oblasti Evropy.

5.4 Šíření

Z topologií výsledných stromů vyplývá závěr, že zde máme pravděpodobně tři až čtyři linie šíření, které by mohly odpovídat refugiím během zalednění (viz obrázek 23) (Hewitt 1999, Hewitt 2001). Nicméně nedostatek dat neumožňuje komplexnější náhled.

Linie I, zahrnující vzorky ze Španělska, zřejmě vychází z Iberského poloostrova, odkud se pravděpodobně mohla šířit na sever. Vzhledem k chybějícím vzorkům z této oblasti se můžeme pouze domnívat, že se kudlance mohlo povést překonat Pyreneje a rozšířit se tak severněji. Není vyloučeno, že se takto linie mohla dostat do Francie, Německa a případně do Itálie.

Šíření linie II pravděpodobně probíhalo z oblasti Krymu, odkud se *M. religiosa* mohla dostávat dále do Evropy, přes Rumunsko, Maďarsko a Ukrajinu mohla doputovat až do oblasti východního Slovenska nebo východního Polska, kde jsou známy stabilní populace (Liana 2007). Tímto způsobem mohla obejít pohoří Tatry i Jeseníky, které by mohly být přirozenou bariérou jejímu šíření. Nicméně opět se zde vyskytuje, stejně jako u linie I, nedostatek vzorků z těchto oblastí.

Třetí linie zahrnuje ostatní vzorky a mohli bychom ji označit jako balkánskou linii. Pravděpodobným refugiem této linie je zřejmě balkánský poloostrov. Odtud se pak mohla šířit dále severovýchodním směrem do oblasti Chorvatska, Slovenska, Bulharska. V rámci linie neměly jednotlivé vzorky stabilní pozici ve fylogenetických stromech a vzorky z jednotlivých států byly vzájemně různě promíchány. Nelze tedy vyslovit žádný závěr o fylogenezi jednotlivých jedinců v rámci této linie. Stabilně vychází vzorky z Řecka, které spadají do stejné skupiny, což je zřejmě způsobeno vzájemnou příbuzností jedinců. Pocházejí totiž ze stejné lokality. Podobně jsou na tom vzorky pocházející z České republiky, které byly sesbírány v Žehuňské oboře. Zajímavé postavení v rámci stromů mají vzorky z Chorvatska a jeden z Rakouska, které se drží v blízkosti linie I a linie II. Tvoří společný klastr spolu se vzorky, které pochází z oblasti Přerova nad Labem.

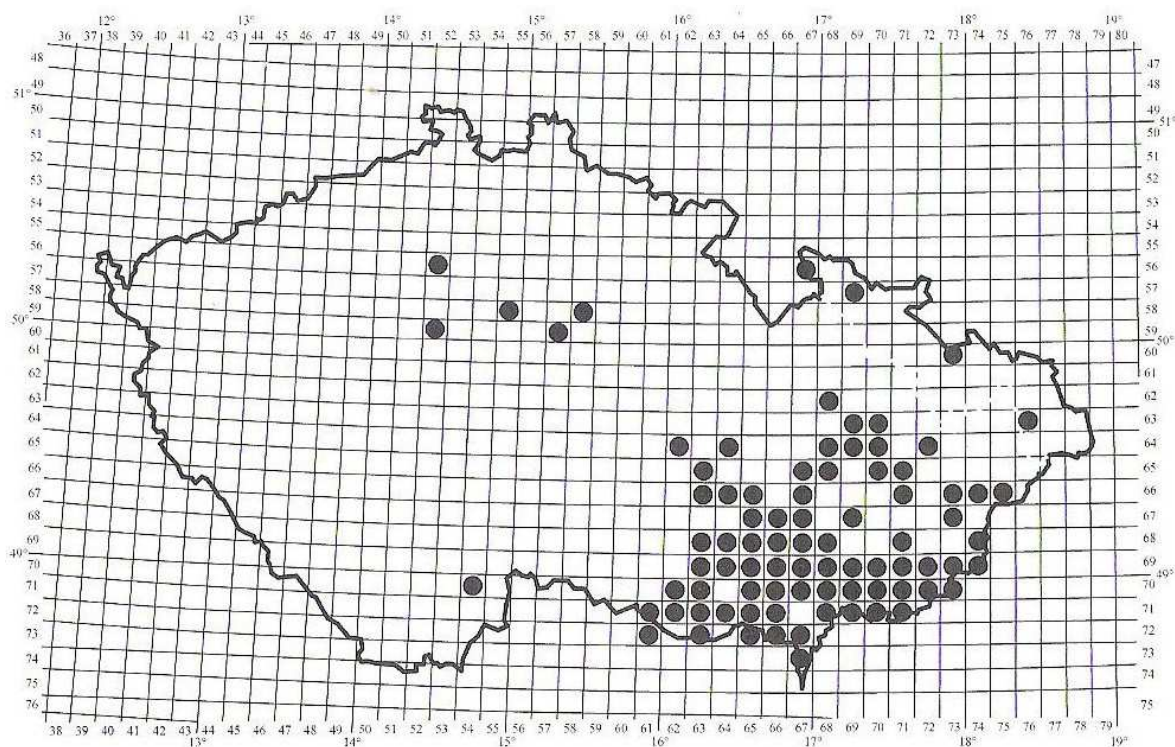


Obrázek 23: Hypotetická mapa šíření kudlanky nábožné vytvořená na základě získaných dat.

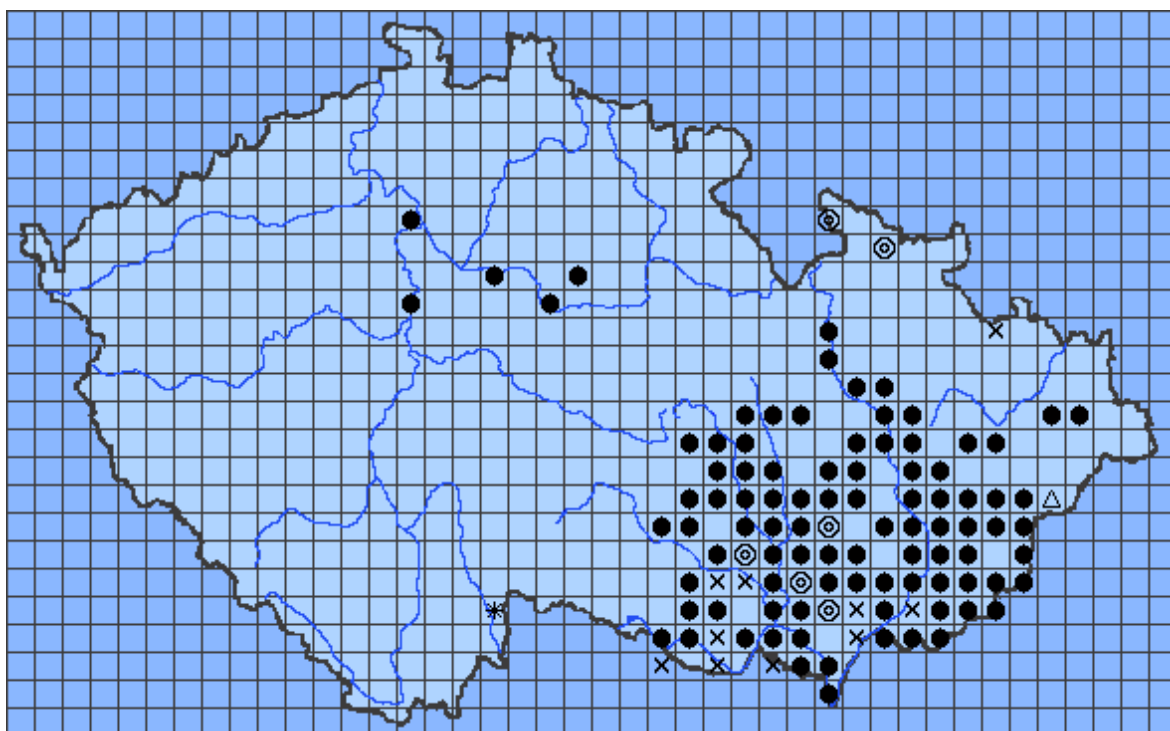
Není pochyb o tom, že se *Mantis religiosa* šíří na sever našeho území. Obecně se její areál rozšiřuje. Janšta et al. (2008) uvádí podrobnou mapu výskytu z tohoto roku (obr. 24). Pokud ji porovnáme se současnou mapou rozšíření získanou z www.biolib.cz (obr. 25), je jasně patrné, že se areál kudlanky rozšiřuje. Za necelé čtyři roky přibýlo 26 lokalit.

Klimatické změny ovlivňují mnoho druhů živočichů a to včetně hmyzu. Na hmyzí skupiny působí takové změny více, jelikož jsou poikilotermní a mají kratší životní cykly. Rozšíření druhů, ať už současné či budoucí, závisí na podmínkách prostředí. Nicméně posun hranic areálů jako odpověď na změny prostředí silně ovlivňuje schopnost disperze (Buse & Griebeler 2011). Šíření kudlanky jako teplomilného hmyzu by tedy mělo podporovat oteplování klimatu. Nicméně je zapotřebí i vhodné prostředí pro její život. Početnost tohoto druhu je spojená s diverzitou lokality, mikrohabitatu a stupněm izolace lokality. Právě takovéto lokality jsou považovány za významná refugia pro ponto-mediteránní faunu (Krištín et al 2004). Příkladem rozšiřování areálu severním směrem vlivem recentního oteplování klimatu mohou být někteří zástupci rovnokřídlých. Například druh *Metrioptera roeselii* Hagenbach 1822,

který se rozšířil v rámci Velké Británie právě díky vzrůstu teploty a dostupnosti vhodných habitatů (Gardiner 2009).



Obrázek 24: Mapa rozšíření v České republice v roce 2008 (převzato z Janšta et al 2008).



Obrázek 25: Mapa rozšíření v České republice v roce 2012 (převzato z www.biolib.cz).

Pokud se zaměříme na polohu českých populací v kladogramu, tak vzorky pocházející z Moravy se v topologii vyskytují v různých pozicích na stromu. Vzorky z Čech, které zastupuje lokalita v oblasti Přerova nad Labem a Žehuňská obora, stojí odděleně. *M. religiosa* se v Čechách považuje za nepůvodní (Novák & Spitzer 1982). Vzhledem k tomu, že kudlanka nelétá nijak zvlášť dobře a přemísťuje se pouze na krátké vzdálenosti (Chládek 1998), je tato teorie pravděpodobná. Tedy možnost, že by se kudlanka dostala aktivním přeletem do Čech sama, se zdá být nepravděpodobná. Další možností je „hitch-hiking“, kdy mohla využít dopravních prostředků a „svést se“ (Janšta et al. 2008). Možné je také vysazení z chovů (Chládek 1998), což by vysvětlovalo pozici českých populací na kladogramu. Vzhledem k tomu, že populace z Přerova spadá do blízkosti vzorků z Chorvatska, není vyloučeno, že přerovská populace je skutečně uměle vysazená.

S šířením druhu je spojena také schopnost udržet se na nově obsazených lokalitách. K tomu by mohla pomoci i schopnost partenogeneze, jako doplňkový způsob rozmnožování. Bazyluk (1977) a Chládek (1998) zmiňují tuto schopnost u *M. religiosa*. Nicméně se tato skutečnost nezdá být pravděpodobná. V přírodě by se musely vyskytovat populace složené pouze ze samic, které by vznikly partenogenetickým množením z jediné matky. Ty však nebyly pozorovány. O schopnosti partenogeneze se nezmiňují ani studie věnované kanibalismu a kopulačnímu chování *M. religiosa* (Prokop & Václav 2008).

5.5 Mikrosatelity

Mikrosatelity, známé svým vysokým interspecifickým a intraspecifickým polymorfismem na úrovni DNA, jsou v současné době velmi používaným genetickým markerem, který slouží k odhalování nejen fylogeografické struktury jednotlivých druhů, ale také k podrobnějšímu genetickému mapování či k určování paternity. V poslední době se tyto markery začaly běžněji používat i při studiu hmyzích skupin (Valade et al. 2009, Theissinger et al. 2011, Duennes et al. 2012).

Předkládaná diplomová práce je také z části zaměřena na vývoj, testování a předběžnou analýzu mikrosatelitových lokusů. V rámci řádu Mantodea bylo dosud známo pouze 11 lokusů vyvinutých specificky na druh australské kudlanky *Ciulfina rentzi* (Attard et al. 2009, Umbers et al. 2011). Vzhledem k tomu, že tento druh je kudlance nábožné značně nepříbuzný (Svenson & Whitting 2009), bylo přistoupeno

k navržení lokusů de novo a ne metodou cross-amplifikace lokusů z druhu příbuzného. Metoda cross-amplifikace se navíc nepovažuje za tak vhodnou, protože velmi často dochází k namnožení lokusů, které jsou méně druhově specifické a hlavně málo polymorfní (Ellegren et al., 1995).

Nové lokusy byly navrženy firmou Genoscreen Company (Lille, France) metodou 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing technologií obdobně jako v práci Černá & Straka (2012). Z celkového počtu 95 navržených lokusů prošlo dalšími amplifikačními testy pouze 9 lokusů, které se bezproblémově množily a bylo možné je zahrnout do celkem dvou multiplexů bez jakýchkoliv navzájem se ovlivňujících interakcí. Přestože lokusy vykazují v rámci zkoumaného areálu kudlanky nábožné (celkem testováno 107 jedinců z 53 populací 11 států Evropy) poměrně vysokou variabilitu (3-26 lokusů na jednu alelu), je nutné tyto výsledky považovat za předběžné, protože jednotlivé populace nebyly dostatečně provzorkovány (průměrně bylo testováno 1 - 2 jedinců z populace). Za dostačující počet jedinců z důvodů zjištění co největšího počtu možných alel, Hardy-weibergovy rovnováhy a stupně heterozygotnosti se považuje cca 20 jedinců z populace (Černá & Straka 2012).

Nicméně při podrobnější analýze jedinců sebraných pouze na území ČR, respektive na jedné relativně dobře prosbírané lokalitě Žehuňská obora (sebráno celkem 13 jedinců se počet alel výrazně nezmenšil ($k=3-9$, respektive $k=2-7$). Lze se tudíž domnívat, že variabilita lokusů pro zkoumání například fylogeografie druhu na různém měřítku by mohla být dostatečná (Attard et al. 2009, Valade et al. 2009).

Jak je patrné z výsledků předběžné analýzy mikrosatelitových lokusů, ne všechny lokusy se podařilo amplifikovat pro všechny vzorky DNA. To může být způsobeno buď špatnou kvalitou dané DNA (některé vzorky byly skladovány delší dobu před samotnou izolací DNA) a nebo nepřesným nasedáním některých primerů. Tyto nedostatky musí být v budoucnu ještě otestovány na čerstvých vzorcích DNA, kterou lze, jak se v průběhu výzkumu ukázalo, izolovat v dostatečném množství z části střední či zadní končetiny kudlanky.

Vzhledem k tomu, že žádný z primerů nenasedal na DNA jedinců ze skupiny outgroups, lze předpokládat, že mikrosatelitové primery budou nejspíše druhově nebo maximálně vnitrorodově specifické.

6. Shrnutí

- Byly rozpoznány tři pravděpodobné linie šíření *M. religiosa*. První zřejmě vychází z Iberského poloostrova a zahrnuje vzorky ze Španělska. Tato linie by se mohla dále šířit na sever. Druhá linie zřejmě směřuje z oblasti Krymu, kde by se mohlo nacházet jedno z refugií a odkud se kudlanka šířila dále do Evropy. Třetí linie pak představují vzorky, které jsou pravděpodobně součástí balkánské linie šíření.
- Vzorky pocházející z oblasti Čech, konkrétně z Přerova nad Labem, spadají do příbuznosti se vzorky z Chorvatska. Další česká lokalita Žehuňská obora stojí v kladogramu daleko od lokality Přerov, a tudíž se nezdá, že by si tyto populace byly nějak blízce příbuzné. To by mohlo naznačovat skutečnost, že kudlanky v Přerově zde byly vysazeny.
- Podařilo se vyvinout celkem 9 funkčních mikrosatelitových lokusů pro druh *M. religiosa*, které byly rozděleny do dvou multiplexů bez nežádoucích ovlivňujících se interakcí. Vzhledem k nedostatečnosti počtu vzorků z lokalit se zatím jedná pouze o předběžné výsledky.
- Pro lepší a detailnější prozkoumání fylogeneze a fylogeografie *M. religiosa* by bylo vhodné doplnit molekulární data o větší počet vzorků z dalších lokalit.

7. Použitá literatura

(sekundární citace jsou označeny * před jménem prvního autora)

ABU-DANNOUN, O. & KATBEH-BADER, A. (2007): Mantodea of Jordan. *Zootaxa* 1617: 43-56.

ATTARD, C. R. M., HOLWELL, G. I., SCHWARTZ, T. S., UMBERS, K. D. L., STOW, A., HERBERSTEIN, M. E. & BEHEREGARAY, L. B. (2009): Microsatellite markers for the praying mantid *Ciulfina rentzi* (Liturgusidae). *Molecular Ecology Resources*, 9: 1480-1482.

BANDELT, H. J., FORSTER P. & RÖHL, A. (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.

BARD, E. (1999): Ice Age Temperatures and Geochemistry. *Science, New Series* 284 (5417): 1133-1134.

BARKER, F. K. & LUTZONI, F. M. (2002). The Utility of the Incongruence Length Difference Test. *Systematic Biology*, 51: 625-637.

BATTISTON, R. & FONTANA, P. (2010): Colour change and habitat preferences in *Mantis religiosa*. *Bulletin of Insectology*, 63(1): 85-89.

BAZYLUK, W. (1960): Die geographische Verbreitung und Variabilität von *Mantis religiosa* (L.) (Mantodea, Mantidae), sowie Beschreibungen neuer Unterarten. *Annales Zoologici* (Warszawa), 18: 231-272.

*BAZYLUK, W. (1977): Blattodea et Mantodea - Karaczany i modlilizski (Insecta). Fauna Polski - Fauna Poloniae, Tom 6, PAN - *Institut Zoologii, Warszawa*, pp. 109 -150.

BERG, M. K., DÜKER, C., KELLER, M., KRÜGER, B., LÜBCKE, N. & LÜBCKE, T. (2008): Die Gottesanbeterin, *Mantis religiosa* Linnaeus, 1758 (Mantodea, Mantidae), im Freistaat Sachsen. *Entomologische Nachrichten und Berichte*, 52: 93-98.

BILOUSOV, O. O., CHAPLINSKA, M. V., ZHUK, O. W., GOROBCHYSHYN, V. A. & KOZERETSKA, I. A. (2011): *Mantis religiosa* (Dyctioptera, Mantidae) infected by Wolbachia. *Vestnik zoologii*, 45 (3): e- 39 - e-41.

BILTON, D. T., MIROL, P. M., MASCHERETTI, S., FREDGA, K. & ZIMA, J. (1998): Mediterranean Europe as an Area of Endemism for Small Mammals Rather than a Source for Northwards Postglacial Colonization. Proceedings: *Biological Sciences*, 265 (1402): 1219-1226.

*BROWNSTEIN, M. B. J., CARPTEN, J. B. D., SMITH, J. B. R. (1996): Modulation of non-templated nucleotide addition by TaqDNA polymerase: Primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques*, 20: 1004-1010.

BUSE, J., GRIEBELER, E. M. (2011): Incorporating classified dispersal assumptions in predictive distribution models - A case study with grasshoppers and bush-cricket. *Ecological Modelling*, 222: 2130-2141.

CANNINGS, R. (2007): Recent range expansion of the Praying Mantis, *Mantis religiosa* Linnaeus (Mantodea:Mantidae) in British Columbia. *Journal of the Entomological Society of British Columbia*, 104: 73-80.

*ČEJCHAN, A. (1983): K poznání orthopteroidního hmyzu (s.l.) Bílých Karpat (Grylloptera, Orthoptera s.str., Dermaptera, Dictyoptera). - *Čas. Nár. Muz. Praha, řada přírodověd.*, 152: 101-119.

ČERNÁ, K. & STRAKA, J. (2012): Identification of 37 microsatellite loci for *Anthophora plumipes* (Hymenoptera:Apidae) using next generation sequencing and their utility in related species. *Eur.J. Entomol.*, 109: 155-160.

DAPPORTO, L. (2009): Speciation in Mediterranean refugia and post-glacial expansion of *Zerynthia polyxena* (Lepidoptera, Papilionidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 48: 229-237.

DICK, CH. W., ROUBIK, D. W., GRUBE, R. K. F. & BERMINGHAM, E. (2004): Long-distance gene flow and cross-Andean dispersal of lowland rainforest bees (Apidae: Euglossini) revealed by comparative mitochondrial DNA phylogeography. *Molecular Ecology*, 13: 3775-3785.

DUENNES, M. A., LOZIER, J. D., HINES, H. M. & CAMERON, S. A. (2012): Geographical patterns of genetic divergence in the widespread mesoamerican bumble bee *Bombus ephippiatus* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64 (1): 219-231.

*EHRMANN, R. (2002): Mantodea: Gottesanbeterinnen der Welt. *Natur und Tier, Münster*.

EHRMANN, R. & KOÇAK, A. Ö. (2009): The Neotropical mantids (Insecta: Dictyoptera: Mantodea) (Ehrmann - 30.v.2009). *Cesa News*, 49: 1-18.

ELLEGREN, H., PRIMMER, C. R. & SHELDON, B. C. (1995): Microsatellite evolution: Directionality or bias in locus selection? *Nature Genetics*, 11: 60-62.

EMERSON, B. C., OROMÍ, P. & HEWITT G. M. (2000): Tracking colonization and diversification of insect lineages on island: mitochondrial DNA phylogeography of *Tarphius canariensis* (Coleoptera: Colydiidae) on the Canary Islands. *Proc. R. Soc. Land. B*, 267: 2199-2205.

FAGAN, W. F. & HURD, L. E. (1991): Direct and Indirect Effects of Generalist Predators on a Terrestrial Arthropod Community. *American Midland Naturalist*, 126(2): 380-384.

FAGAN, W. F. & HURD, L. E. (1994): Hatch density variation of a generalist arthropod predator: population consequences and community impact. *Ecology*, 75(7): 2022-2032.

- FAGAN, W. F., MORAN, M. D., RANGO, J. J. & HURD, L. E. (2002): Community effects of praying mantids: a meta-analysis of the influence of species identity and experimental design. *Ecological Entomology*, 27: 385-395.
- FARRIS, J. S., KÄLLERSJÖ, M., KLUGE, A. G. & BULT, C. (1994). Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10: 315-319.
- FEEHAN, J., HARLEY, M. & VAN MINNEN, J. (2008): Climate change in Europe. 1. Impact on terrestrial ecosystems and biodiversity. A review. *Agron. Sustain. Dev*, 29: 409-421.
- FELSENSTEIN, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- GALTIER, N., NABHOLZ, B., GLÉMIN, S. & HURST, G. D. D. (2009): Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18: 4541-4550.
- GARDINER, T. (2009): Macropterism of Roesel's bushcricket *Metrioptera roeselii* in relation to climate change and landscape structure in eastern England. *Journal of Orthoptera Research*, 18 (1): 95-102.
- GEMENO, C. & CLARAMUNT, J. (2006): Sexual Approach in the Praying Mantis *Mantis religiosa* (L.). *Journal of Insect Behavior*, 19 (6): 731-740.
- GEMENO, C., CLARAMUNT, J. & DASCA, J. (2005): Nocturnal Calling Behavior in Mantids. *Journal of Insect Behavior*, 18 (3): 389-403.
- GEPP, J. & KREISSL, E. (1988): Zum gegenwärtigen Stand des Vorkommens der Gottesanbeterin, *Mantis religiosa* L., in der Steiermark (Insecta, Mantodea). *Mitt. naturwiss. Ver. Steiermark*, 118: 185-191.

GRIMALDI, D. (2003): A Revision of Cretaceous Mantises and Their Relationship, Including New Taxa (Insecta: Dictyoptera: Mantodea). *American Museum Novitates*, 3412: 1-47.

GRUCHALA, Š. (2010): Nové nálezy kudlanky nábožné *Mantis religiosa* na severní Moravě (Česká republika). *Časopis Slezského Muzea Opava (A)*, 59: 96.

*GURNEY, A. B. (1950): Praying mantids of United States, native and introduced. *Smithson. Inst. Annu. Rep.* p. 339-362.

HALL, T. A. (1999): Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series* 41: 95-98.

HANÁK, F. & HUDEČEK, J. (2001): Rozšíření kudlanky nábožné (*Mantis religiosa*) v českých zemích se zřetelem k jejímu rozšíření na střední Moravu a do Slezska: *Čas. Slez. Muz. Opava (A)*, 50: 137-142.

HARRY, M., SOLIGNAC, M. & LACHAISE, D. (1998): Molecular evidence for parallel evolution of adaptive syndromes in fig-breeding *Lissocephala* (Drosophilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9: 542-551.

HEWITT, G. (1999): Postglacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-112.

HEWITT, G. M. (2001): Speciation, hybrid zones and phylogeography: or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10: 537-549.

HILL, S. (2007): Sound generation in *Mantis religiosa* (Mantodea: Mantidae): stridulatory structures and acoustic signal. *Journal of Orthoptera Research*, 16(1): 35-49.

*HOFFER, A. (1937): Nálezy některých vzácných československých Orthopter. *Věda přírodní*, 18: 22-23.

CHLÁDEK, F. (1998): K současnému stavu rozšíření kudlanky nábožné (*Mantis religiosa* Linnaeus, 1758) na Moravě a poznámky k její biologii (Insecta, Mantoptera). *Tetrix* 1: 1-8.

JANŠTA, P. (2006): Mantodea - Kudlanky. Pp. 136-137. In: Farkač J., Král D. & Škorpík M. (eds.): *Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí. (Red List of Threatened Species in the Czech Republic. Invertebrates.)* Příroda (AOPK), Praha. 760 pp. (in Czech and English).

JANŠTA, P., VRABEC, V., STRÁNSKÝ, J., MIKÁT, M. & MOCEK, B. (2008): Výskyt kudlanky nábožné (*Mantis religiosa*) (Mantodea: Mantidae) ve středních Čechách a její rozšíření v České republice. *Klapalekiana*, 44: 21-25.

JERMIIN, L. S. & CROZIER, R. H. (1994): The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: Sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *Journal of Molecular Evolution*, 38: 282-294.

KALINOWSKI, S. T., TAPER, M. L. & MARSHALL, T. C. (2007): Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099-1106..

KAMBHAMPATI, S. (1995): A phylogeny of cockroaches and related insects based on DNA sequence of mitochondrial ribosomal RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 2017-2020.

KIM, J. (1996). General Inconsistency Conditions for Maximum Parsimony: Effects of Branch Lengths and Increasing Numbers of Taxa. *Systematic Biology*, 45: 363-374.

KOČÁREK, P. (2005): Řád Mantodea. The order Mantodea, pp. 56-71. In Kočárek P., Holuša, J. & Vidlička, L.: Blattaria, Mantodea, Orthoptera and Dermaptera České a Slovenské republiky. Blattaria, Mantodea, Orthoptera and Dermaptera of the Czech and Slovak Republics. *Kabourek, Zlín*, 349 pp. (in Czech and English).

KRAL, K. & DEVETAK, D. (1999): The visual orientation strategies of *Mantis religiosa* and *Empusa fasciata* reflect differences in the structure of their visual surroundings. *Journal of Insect Behavior*, 12(6): 737-752.

KRIŠTÍN, A., KAŇUCH, P. & SÁROSSY, M. (2004): Grasshoppers and crickets (Orthoptera) and mantids (Mantodea) of sand dunes in the Danube lowland (S-Slovakia). *Linzer biol. Beitr.*, 36 (1): 273-286.

KUKLA, J. G., BENDER, M. L., DE BEAULIEU, J. L., BOND, G., BROECKER, W. S., CLEVERINGA, P., GAVIN, J. E., HERBER, T. T. D., IMBRIE, J., JOUZEL, J., KEIGWIN, L. D., KNUDSEN, K-L., MCMANUS, J. F., MERKT, J., MUHS, D. R., MÜLLER, H., POORE, R. Z., PORTER, S. C., SERET, G., SHACLECTON, N. J., TURNER, C., TZEDAKIS, P. C. & WINOGRAD, I. J. (2002): Last Interglacial Climates. *Quaternary Research*, 58: 2-13.

*LEMON, F. (1998): Teplomilná kudlanka nábožná v Jeseníku. - *Roč. Vlast. Mus. Spol., Jeseník*, 1998: 36.

LIANA, A. 2007: Distribution of *Mantis religiosa* (L.) and its changes in Poland. *Fragmenta Faunistica*, 50 (2): 91-125.

LUNT, D. H., ZHANG, D.-X., SZYMURA, J. M. & HEWITT, G. M. (1996): The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5 (3): 153-165.

MARSHALL, T. C., SLATE, J., KRUUK, L. E. B. & PEMBERTON J. M. (1998): Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7: 639-655.

*NENADÁL, S. (1995): Record of Praying Mantis, *Mantis religiosa* (L.) on the Bohemian-Moravian highlands (in czech with German summary). *Vlast. Sbor. Vysočiny, Odd. věd. přír.*, 12: 247-249.

NOVÁK, I. & ŠPITZER, K. (1982): *Ohrožený svět hmyzu*, Academia Praha, 138 pp.

*OTTE, D. & SPEARMAN, L. (2005): Mantida Species File. Catalog of the Mantids of the world. *Association of insect diversity*, Philadelphia

PAGE, R. D. M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357–358.

*PAX, F. (1921): Betraig zur Orthopterenfauna Schlesiens. *Ztschr. Wiss.Insektenbiol.*, 3 (1920- 1921): 41-42.

PONIATOWSKI, D., HEINZE, S. & FARTMANN, T. (2012): The role of macropters during range expansion of a wing-dimorphic insect species. *Evol Ecol*, 26: 759-770.

PROKOP, P. & VÁCLAV, R. (2004): Males Respond to the Risk of Sperm Competition in the Sexually Cannibalistic Praying Mantis, *Mantis religiosa*. *Ethology*, 111: 836-848.

PROKOP, P. & VÁCLAV, R. (2008): Seasonal aspects of sexual cannibalism in the praying mantis (*Mantis religiosa*). *J Ethol*, 26: 213-218.

RATHET, I. H. & HURT, L. E. (1983): Ecological Relationships of Three Co-occurring Mantids, *Tenodera sinensis* (Saussure), *T. angustipennis* (Saussure), and *Mantis religiosa* (Linnaeus). *American Midland Naturalist*, 110 (2): 240-248.

RONDÓN, A. A. A., LOMBARDO, F. & JANTSCH, J. L. (2007): Checklist of the Neotropical mantids (Insecta, Dictyoptera, Mantodea). *Biota Colombiana*, 8(2): 105-158.

RONQUIST, F. & HUELSENBECK J. P. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.

SCHWARZ-WAUBKE, M., SCHWARZ, M. & LAISTER, G. (2002): Neufund der Gottesanbeterin *Mantis religiosa* (Linnaeus 1758) (Mantodea, Mantidae) für Oberösterreich (Österreich). *Beitr. Naturk. Oberösterreichs*, 11: 461-464.

SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H. & FLOOK, P. (1994): Evolution, weighting, phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651-701.

STAMATAKIS, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688-2690.

SVENSON, G. J. & WHITING, M. F. (2004): Phylogeny of Mantodea based on molecular data: evolution of a charismatic predator. *Systematic Entomology*, 29: 359-370.

SVENSON, G. J. & WHITING, M. F. (2009): Reconstructing the origins of praying mantises (Dictyoptera, Mantodea): the roles of Gondwanan vicariance and morphological convergence. *Cladistics*, 25: 468 – 514.

SWOFFORD, D. L. (2002): PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

TABERLET, P., FUMAGALLI, L., WUST-SAUCY, A-G. & COSSON, J-F. (1998): Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7: 453-464.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI & M., KUMAR, S. (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24 (8): 1596-1599.

THEISSINGER, K., BALINT, M., HAASE, P., JOHANNESSEN, J., LAUB, E. I. & PAULS, S. U. (2011): Molecular data and species distribution models reveal the

Pleistocene history of the mayfly *Ameletus inopinatus* (Ephemeroptera: Siphonuridae). *Freshwater biology*, 56 (12): 2554-2566.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T. J. (1994): Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.

TICHÁ, K. 2005: Record of *Mantis religiosa* (Mantodea: Mantidea) in NNM Švarec (Czech Republic, Bohemian - Moravian Highlands). *Acta rerum naturalium*, 1: 155.

UMBERS, K. D. L., HOLWELL, G. I., STOW, A. J. & HERBERSTEIN, M. E. (2011): Molecular evidence for variation in polyandry among praying mantids (Mantodea: Ciulfina). *Journal of Zoology* 284 (1): 40-45.

VALADE, R., KENIS, M, HERNANDEZ-LOPEZ, A, AUGUSTIN, S., MENA, N. M., MAGNOUX, E., ROUGERIE, R., LAKATOS, F., ROQUES, A. & LOPEZ-VAAMONDE, C. (2009): Mitochondrial and microsatellite DNA markers reveal a Balkan origin for the highly invasive horse-chestnut leaf miner *Cameraria ohridella* (Lepidoptera, Gracillariidae). *Molecular Ecology*, 18 (16): 3458-3470.

*VIDLIČKA, L' (2001): *Fauna Slovenska. Blattaria-šváby, Mantodea - modlivky (Insecta: Otrhopteroidea). Fauna of Slovakia. Blattaria - Cockroaches, Mantodea - Mantids (Insecta: Otrhopteroidea)*. Veda, Bratislava, 169 pp (in Slovak).

VILLESEN, P. (2007), FaBox: an online toolbox for fasta sequences, *Molecular Ecology Notes* 7 (6), 965–968.

WAGAN, M. S., SOOMRO, N. M. & SOOMRO, M. H. (1995): Praying Mantids (Mantodea) of Sindh Province, Pakistan. *J. Orth. Res.* 4, pp. 161 – 162.

WARE, J. L., LITMAN, J., KLAS, K.-D. & SPEARMAN, L. A. (2008): Relationships among the major lineages of Dictyoptera: the effect of outgroup selection on dictyopteran tree topology. *Systematic Entomology*, 33: 429-450.

WEISS S. & FERRAND N. (2007): Phylogeography of Southern European Refugia. Springer.

YAGER, D. D. & HOY, R. R. (1989): Audition in the praying mantis, *Mantis religiosa* L.: identifikacion of an interneuron mediating ultrasonic hearing. *Journal of Comparative Physiology A* 165: 471-493.

YANG, Z. & RANNALA, B. (1997). Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo Method. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 717-724.

YODER, A. D., IRWIN, J. A. & PAYSEUR, B. A. (2001). Failure of the ILD to Determine Data Combinability for Slow Loris Phylogeny. *Systematic Biology*, 50: 408-424.

*ZÁLESKÝ, M. (1935): "Moravská brána" ve vývoji živočišstva. *Záhor. Kronika*, 17 (1934-1935): 51-53.

ZIMA, J., MACHOLÁN, M., MUNGLINGER, P. & PIÁLEK, J. (2004): *Genetické metody v zoologii*. Nakladatelství Karolinum. Praha. 240 pp.

8. Přílohy

Všechny přílohy se nacházejí na přiloženém DVD, které obsahuje složky:

1. Datasets – složka obsahuje všechny datasets, které byly použité pro analýzy.
2. MrBayes – obsahuje spouštěcí programy a výsledky bayesovské analýzy.
3. RAxML – obsahuje spouštěcí programy a výsledky analýzy maximum likelihood.
4. P – distance – zahrnuje soubory obsahující hodnoty p-distancí vytvořené v programu MEGA.
5. Cervus – výsledky analýz mikrosatelitů.